

**Epigenetische und pharmakogenetische Analysen  
der Pathogenese und Therapie der Akuten Myeloischen Leukämie**

Dissertation  
zur Erlangung des Grades  
des Doktors der Naturwissenschaften  
der Naturwissenschaftlich-Technischen Fakultät III  
Chemie, Pharmazie, Bio, und Werkstoffwissenschaften  
der Universität des Saarlandes

von

Christian-Lars Dransfeld  
Diplom Biologe

Saarbrücken  
2010

Tag des Kolloquiums:	22.10.2010
Dekan:	Prof. Dr. Stefan Diebels
Berichterstatter:	Prof. Dr. Gerald Thiel Prof. Dr. Ulrich Mahlkecht, PhD
Prüfungsvorsitz:	Prof. Dr. Manfred Schmitt
Akad. Mitarbeiter:	Priv.-Doz. Dr. Jens Mayer

Aus dem Zentrum für Human- und Molekularbiologie der Universität des Saarlandes  
(Geschäftsführender Leiter: Prof. Dr. Manfred J. Schmitt)

in Kooperation mit dem

José Carreras Zentrum für Immun- und Gentherapie der Universität des Saarlandes  
(Direktor: Prof. Dr. med. Ulrich Mahlknecht, PhD)

# Inhaltsverzeichnis

<b>Inhaltsverzeichnis</b> .....	<b>I</b>
<b>Abbildungsverzeichnis</b> .....	<b>V</b>
<b>Tabellenverzeichnis</b> .....	<b>VII</b>
<b>Abkürzungsverzeichnis</b> .....	<b>VIII</b>

## **1 Einleitung**..... **1**

### **1.1 Epigenetik**..... **1**

1.1.1 Chromatinremodeling - globale epigenetische Genregulation .....	2
1.1.1.1 Histon-Acetylierungsgrad.....	2
1.1.1.2 DNA- und Histon-Methylierung.....	3
1.1.2 Lokal spezifische epigenetische Genregulation .....	3
1.1.3 Histon-Deacetylasen .....	4
1.1.3.1 Klasse I, II und IV HDACs.....	4
1.1.3.2 Klasse III HDACs - Sirtuine.....	5
1.1.3.3 HDAC und SIRTUIN-Substrate und zelluläre Funktionen .....	5
1.1.3.4 SIRT3 – Hauptdeacetylase der Mitochondrien.....	8
1.1.3.5 Sirtuine - SIRT3 - im Energiemetabolismus.....	9
1.1.3.6 Online Monitoring des zellulären Energiestoffwechsels mittels Biosensor-Chip System... ..	10
1.1.4 HDACs und Krebs .....	11
1.1.5 HDAC-Inhibitoren in der epigenetischen Krebstherapie .....	12
1.1.6 HDAC-Inhibitoren - Mechanismus der HDAC Inaktivierung .....	14

### **1.2 Akute Myeloische Leukämie (AML)**..... **16**

1.2.1 Definition, Inzidenz, Diagnose der AML.....	16
1.2.2 Systematische Einteilung der AML .....	17
1.2.3 Pathogenese und Prognostik – molekulare Ursachen der AML.....	18
1.2.4 Karyotyp/Zytogenetik – Prognosefaktoren bei AML.....	20
1.2.5 Therapie der AML.....	21
1.2.5.1 Standardtherapie Ara-C – Wirkung und Therapieeinsatz .....	21
1.2.5.2 Ara-C Metabolismus.....	22
1.2.5.3 Ara-C Pharmakokinetik .....	23
1.2.5.4 Patientenspezifisches Ansprechen auf Ara-C Therapie .....	23

### **1.3 Single Nucleotide Polymorphisms und Pharmakogenetik**..... **24**

1.3.1 Pharmakogenetik in AML – SNPs im Ara-C Metabolismus.....	24
--	----

### **1.4 Epigenetik in der Pathogenese und Therapie von AML**..... **26**

1.4.1 HDACs in der Pathogenese von AML .....	27
1.4.2 HDAC-Inhibitoren in der Therapie von AML .....	28

### **1.5 Aufgabenstellung / Ziel**..... **30**

## **2 Material und Methoden**..... **31**

### **2.1 Labormaterialien**..... **31**

### **2.2 Nukleinsäuren**..... **31**

2.2.1 Plasmide .....	31
2.2.1.1 erworbene Plasmide.....	31
2.2.1.2 Selbst hergestellte, veränderte Plasmide.....	31
2.2.2 Oligonukleotide.....	32

### **2.3 Bakterien**..... **33**

2.3.1 Bakterienstämme.....	33
2.3.2 Aufbewahrung und Kultivierung.....	33
2.3.3 Herstellung kompetenter <i>E. coli</i> .....	33
2.3.4 Transformation von <i>E. coli</i> mit Plasmid-DNA.....	34

### **2.4 Eukaryotische Zelllinien**..... **34**

2.4.1	Kultivierung eukaryotischer Zelllinien.....	34
2.4.2	Kryokonservierung und Kryokultivierung eukaryotischer Zellen.....	35
2.4.3	Transiente Transfektion mit Plasmid-DNA.....	35
<b>2.5</b>	<b>Bionas System – online monitoring der Bioaktivität von Proteinen.....</b>	<b>36</b>
2.5.1	Transfektion in Biosensor Chips .....	36
2.5.2	Bionas System, ein Biosensor-Chip System .....	37
<b>2.6</b>	<b>Patienten und primäre Proben .....</b>	<b>38</b>
2.6.1	Methoden bei der Probenaufarbeitung .....	39
2.6.1.1	Durchflusszytometrie.....	40
2.6.1.2	Zytogenetik.....	40
<b>2.7</b>	<b>Molekularbiologische Methoden .....</b>	<b>40</b>
2.7.1	Aufreinigung von Plasmid-DNA.....	40
2.7.2	Restriktion von DNA Fragmenten .....	41
2.7.3	Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten .....	41
2.7.4	Ligation von DNA-Fragmenten .....	41
2.7.5	Agarose-Gelelektrophorese.....	42
2.7.6	Nukleinsäurekonzentrationsbestimmung .....	42
2.7.7	DNA-Sequenzierung .....	43
2.7.8	DNA-, RNA-Isolierung und cDNA Synthese .....	43
2.7.8.1	DNA Isolierung mittels Aussalzen .....	43
2.7.8.2	DNA Isolierung mit Phenol/Chlorophorm Extraktion.....	44
2.7.8.3	RNA-Isolierung und cDNA Synthese.....	44
2.7.9	PCR - Polymerase-Kettenreaktion .....	44
2.7.9.1	Mutagenese PCR .....	45
2.7.10	Real-time-PCR .....	45
2.7.11	Allelspezifische TaqMan SNP-Assays.....	47
<b>2.8</b>	<b>Proteinbiochemische und zellbiologische Methoden.....</b>	<b>48</b>
2.8.1	Proteinisolierung - Gesamtzelllysate.....	48
2.8.2	Histon Isolierung.....	49
2.8.3	Bestimmung der Proteinkonzentration.....	49
2.8.4	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese .....	50
2.8.5	Western-Blot und Immundetektion.....	51
2.8.5.1	Transfer-/ Blotvorgang .....	51
2.8.5.2	Immundetektion.....	52
2.8.5.3	Verwendete Antikörper .....	53
2.8.6	Immunpräzipitation .....	53
2.8.7	SIRT3 Deacetylierungs-Aktivitätstest.....	53
2.8.8	Protein- / SIRT3 Stabilitätstest.....	54
2.8.9	Immunfluoreszenz-Mikroskopie .....	54
<b>2.9</b>	<b>Statistische Auswertungen .....</b>	<b>54</b>
<b>2.10</b>	<b>Datenbanken, <i>in silico</i> Analysen - und Computerprogramme .....</b>	<b>56</b>
2.10.1	SNP-Datenbanken .....	56
2.10.2	<i>In silico</i> Analysen .....	56
2.10.3	Computerprogramme.....	56
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>58</b>
<b>3.1</b>	<b>AML-Subtypspezifische Genexpressionsanalysen von HDACs.....</b>	<b>58</b>
3.1.1	HDAC Genexpressionsveränderungen in AML.....	59
3.1.2	HDACs zeigen AML-Subtypspezifische Expressionsmuster .....	62
3.1.3	Korrelationsanalysen der HDAC Expressionen mit zytogenetischen Aberrationen und Karyotyp ..	65
3.1.4	Analyse des Einflusses der Korrelationen von HDAC Expressionsleveln mit zytogenetischen Aberrationen und deren Verteilung in AML-Subtypen auf die Signifikanz der AML-Subtypspezifischen HDAC Expressionsleveln.....	67
3.1.5	Korrelationsanalyse HDAC Expression mit Leukozyten Konzentration und klinischen Parametern .....	68

3.1.6	Korrelationsanalysen zwischen HDAC Expressionsleveln, klinischem Ansprechen und Überleben .....	68
3.1.7	Fazit der AML-Subtypspezifischen HDAC Expressionsanalysen .....	70
<b>3.2</b>	<b>Klasse I HDAC SNPs im Rahmen der Pathogenese der AML .....</b>	<b>71</b>
3.2.1	Identifikation von HDAC nsSNPs .....	71
3.2.2	Validierung der HDAC SNPs in gesunden Probanden vs AML Patienten .....	72
<b>3.3</b>	<b>SIRT3 SNPs – Identifikation, Validierung, funktionelle Analyse .....</b>	<b>74</b>
3.3.1	Identifikation putativer SIRT3 nsSNPs .....	74
3.3.2	Validierung putativer SIRT3 nsSNPs.....	75
3.3.3	Funktionelle Analysen validierter SIRT3 SNPs.....	76
3.3.3.1	Analyse des Einflusses der SIRT3 nsSNPs auf die SIRT3 Stabilität.....	76
3.3.3.2	Analyse des Einflusses der SIRT3 nsSNPs auf SIRT3 Aktivität.....	77
3.3.4	Monitoring der SIRT3 Bioaktivität und Einfluss der SIRT3 SNPs mittels Biosensor-Chip-System .....	78
3.3.4.1	Etablierung der Transfektions-Biosensor-Chip Analysen .....	78
3.3.4.2	SIRT3 nsSNPs haben keinen Einfluss auf SIRT3 Bioaktivität.....	81
<b>3.4</b>	<b>AML Pharmakogenetikik– SNPs in Ara-C metabolisierenden Enzymen .....</b>	<b>82</b>
3.4.1	Promotor- und nsSNPs in Enzymen des Ara-C Metabolismus .....	82
3.4.1.1	Genotyp Frequenzanalysen – Validierung der identifizierten SNPs.....	84
3.4.2	Korrelationsanalysen der Cytidin Deaminase (CDA) Genotypen.....	85
3.4.2.1	Identifikation von CDA SNP C-451T als neuen prognostischen Marker .....	87
3.4.2.2	Identifikation putativer molekularer Basis des CDA SNP C-451T Effekts .....	88
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>90</b>
<b>4.1</b>	<b>AML-Subtypspezifische HDAC Genexpressionsanalysen .....</b>	<b>91</b>
4.1.1	Wichtigkeit der Analysen.....	91
4.1.2	Identifikation von AML M1 als Subtyp mit signifikant höheren HDAC Expressionsleveln – möglicher Einfluss auf HDACi-Therapie? .....	93
4.1.3	Ausschluss putativer Einflüsse anderer Korrelationen auf identifizierte AML-Subtypspezifische HDAC Expressionsmuster.....	93
4.1.3.1	Korrelation AML-Subtypen mit Blastengehalt - PBMCs sind ausreichend genaue Vergleichsreferenz .....	94
4.1.3.2	Korrelation HDAC Expressionsmuster mit zytogenetischen Aberrationen .....	95
4.1.3.3	Korrelation HDAC Expressionsmuster mit Karyotyp .....	96
4.1.4	Aufdeckung weitere Korrelationen .....	97
4.1.4.1	Korrelation HDAC Expressionsmuster mit unerwünschten Nebenwirkungen.....	97
4.1.4.2	Korrelation HDAC Expressionsmuster mit kompletter Remission und Rezidiv Auftreten .....	98
4.1.5	Identifizierte HDACs mit Expressionsveränderungen im Kontext physiologischer Funktionen und onkogenem Potential – was sind AML relevante Ziele? .....	98
4.1.5.1	Klasse II HDACs mit veränderter Expression in AML .....	99
4.1.5.1.1	HDAC5 .....	99
4.1.5.1.2	HDAC6 .....	99
4.1.5.1.3	HDAC9 .....	102
4.1.5.2	SIRTUINE mit veränderter Expression in AML .....	104
4.1.5.2.1	SIRT1 und SIRT3 .....	104
4.1.5.2.2	SIRT4 und SIRT5 .....	105
4.1.5.3	Auswirkungen und mögliche Folgen identifizierter HDAC Expressionsveränderungen ..	107
4.1.5.3.1	HDAC Expressionsveränderungen in AML und gesteigerte ROS Abwehr.....	107
4.1.5.3.2	Zusammenfassende Übersicht der gemeinsamen möglichen Folgen der HDAC Expressionssteigerungen in AML – Überlebensvorteile für AML Zellen und Ansatzpunkt für neue HDAC-Inhibitor-Cocktails?.....	108
4.1.5.4	In Richtung spezifischer, zielgerichteter AML Therapie – Umsetzbarkeit putativer neuer spezifischer HDAC-Inhibitor Cocktails.....	110
<b>4.2</b>	<b>Klasse I HDAC SNP Analysen in gesunden Probanden und AML Patienten.....</b>	<b>111</b>
<b>4.3</b>	<b>SIRT3 SNPs – Identifikation, Validierung, funktionelle Analyse .....</b>	<b>112</b>
4.3.1	Identifikation und Validierung putativer SIRT3 SNPs.....	113
4.3.2	SIRT3 nsSNPs haben keinen Einfluss auf SIRT3 Stabilität und Aktivität.....	114
4.3.3	Monitoring der SIRT3 Bioaktivität .....	115

4.3.3.1	Erfolgreiche Etablierung der Kombination transienter Transfektion und Biosensor-Chip-System zum online monitoring des Einflusses einzelner über-exprimierter Proteine auf den Energiemetabolismus.....	115
4.3.3.2	Vorteile und Einschränkungen der Methode .....	117
4.3.3.3	SIRT3 SNPs haben keinen Einfluss auf SIRT3 Bioaktivität .....	117
4.3.3.4	Erklärung des fehlenden Einflusses der SIRT3 SNPS .....	118
4.3.3.5	SIRT3 hat größeren steigernden Effekt auf Respiration als SIRT1 .....	118
<b>4.4</b>	<b>AML Pharmakogenetik – SNPs in Ara-C metabolisierenden Enzymen .....</b>	<b>119</b>
4.4.1	Identifikation und Validierung von Promotor- und nsSNPs in Enzymen des Ara-C Metabolismus. ....	120
4.4.2	CDA SNP C-451T - ein neuer prognostischer Marker.....	122
4.4.3	Mechanismus hinter der prognostischen Funktion von CDA SNP C-451T .....	123
4.4.4	Erklärung für Korrelation CDA SNP C-451T mit Grad III/IV Augentoxizität.....	124
4.4.5	Erklärung für Korrelation C-451T mit verringerter Gesamtüberlebensrate .....	125
4.4.6	Mit CDA SNP C-451T in Richtung SNP-Markerset.....	125
<b>5</b>	<b>Zusammenfassung.....</b>	<b>127</b>
<b>6</b>	<b>Literaturverzeichnis.....</b>	<b>129</b>
<b>7</b>	<b>Eigene Publikationen und Präsentationen aus dieser Arbeit.....</b>	<b>151</b>
7.1	Publiziert: .....	151
7.2	Eingereicht: .....	151
7.3	Poster Präsentationen:.....	152
<b>8</b>	<b>Anhang.....</b>	<b>153</b>
8.1	Abbildungen .....	153
8.2	Tabellen.....	155
<b>9</b>	<b>Eidesstattliche Versicherung .....</b>	<b>156</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung.....</b>	<b>157</b>

**ABBILDUNGSVERZEICHNIS**

Abbildung 1: Übersicht globaler epigenetischer Regulation am Beispiel des Acetylierungsgrads.....	1
Abbildung 2: Übersicht der wichtigsten Funktionen von HDACs und beeinflusster zellulärer Vorgänge.....	7
Abbildung 3: Rolle von SIRT3 im zellulären Energiemetabolismus.....	10
Abbildung 4: Schema zum „realtime online monitoring“ des zellulären Metabolismus mit Biosensor-Chip-System (Bionas System).....	11
Abbildung 5: Wirkungsweise von HDACi in gesunden und Tumorzellen.....	13
Abbildung 6: Übersicht über Spezifität der HDAC-Inhibitoren.....	15
Abbildung 7: Normale Hämatopoese und Fehlregulierungspunkte bei AML.....	16
Abbildung 8: Modell der molekularen Mechanismen der AML Entstehung.....	19
Abbildung 9: Ara-C Metabolismus mit beteiligten metabolischen Enzymen und Transporter. Nukleosid Transporter (hENT1, hCNT1).....	22
Abbildung 10: Überblick über Methode der Messungen des Einflusses überexprimierter Proteine auf den Zellmetabolismus im Bionas System.....	36
Abbildung 11: Therapieschema der deutschen SHG AML 96 Studie für AML Patienten unter 60 Jahren.....	39
Abbildung 12: Durchschnittliche HDAC Expressionsveränderungen von AML Proben (B) im Vergleich zu den durchschnittlichen Expressionen von Proben gesunder Probanden (A).....	59
Abbildung 13: Gesteigerte Expressionslevel bei SIRT1, 3 und HDAC6 in den meisten AML Proben.....	60
Abbildung 14: Verringerte Expressionslevel bei SIRT4 und verringerte als auch gesteigerte Expressionslevel bei SIRT5 und HDAC5 in den AML Proben.....	61
Abbildung 15: Starke Expressionssteigerung von HDAC9 in den AML Proben.....	62
Abbildung 16: AML-Subtypspezifische durchschnittliche HDAC Expressionslevel mit Signifikanzen.....	63
Abbildung 17: Verteilung CD34+ Zellen in den AML-Subtypen.....	64
Abbildung 18: Korrelation HDAC Expression und Blastengehalt (CD34+).....	64
Abbildung 19: Korrelation der durchschnittlichen HDAC Expressionen mit AML Gruppen mit bestimmten zytogenetischen Aberrationen.....	65
Abbildung 20: Korrelation der durchschnittlichen HDAC Expressionen mit AML mit normalen und aberrantem Karyotyp.....	66
Abbildung 21: Korrelation durchschnittlicher HDAC Expressionen mit kompletter Remission (KR).....	69
Abbildung 22: Korrelation der durchschnittlichen HDAC Expressionen mit Zeit bis zur kompletten Remission (KR).....	69
Abbildung 23: Korrelation der durchschnittlichen HDAC Expressionen mit Auftreten von Rezidiven.....	70
Abbildung 24: Alleldiskriminierung zur Validierung und Frequenzanalyse der identifizierten HDAC nsSNPs bei gesunden Probanden und AML Patienten.....	73
Abbildung 25: Lokalisierung identifizierter SNPs in SIRT3 Domänen.....	74
Abbildung 26: Frequenzanalyse und Validierung der identifizierten putativen SIRT3 SNPs in 640 gesunden kaukasischen Probanden.....	75
Abbildung 27: Stabilitätsanalyse von wtSIRT3 und des Einflusses von SIRT3 SNPs.....	76
Abbildung 28: Analyse der SIRT3 SNPs auf Aktivität im Vergleich zu wtSIRT3 durch Deacetylierungsassay.....	77
Abbildung 29: Optimale Transfektionseffizienz – Bsp. Amaxa Transfektion von wtSIRT3 in HeLa Zellen.....	78
Abbildung 30: Kinetik des wtSIRT3 induzierten Respirationsanstiegs im Vergleich zur Überexpression.....	79
Abbildung 31: Respirationsanstieg durch wtSIRT3.....	80
Abbildung 32: Kein signifikanter Einfluss von wtSIRT3 Überexpression auf Glykolyse.....	80
Abbildung 33: Ergebnisse der Biosensor-Chip Analysen des Einflusses der SIRT3 SNPs auf Respirationsanstieg im Vergleich zu wtSIRT3.....	81
Abbildung 34: Überblick Schlüsselenzyme des Ara-C Metabolismus mit analysierten SNPs.....	82
Abbildung 35: Alleldiskriminierung (Genotyp Frequenzanalyse) der identifizierten SNPs der drei ausgewählten Schlüsselenzyme des Ara-C Metabolismus.....	84
Abbildung 36: Kaplan-Meier Schätzungen der Gesamtüberlebensrate in AML Patienten im Verhältnis zu den Genotypen des CDA SNP C-451T.....	87
Abbildung 37: Kaplan-Meier Schätzungen der krankheitsfreien Überlebensrate in AML Patienten im Verhältnis zu den Genotypen des CDA SNP C-451T.....	88
Abbildung 38: Vergleich der in silico Analyse der CDA Promotorsequenz für C-451T.....	89
Abbildung 39: Frequenz der hoch- oder runterregulierten HDAC Expression in AML Zellen in Relation zu zwei unterschiedlichen Zellpopulationen.....	95
Abbildung 40: Einfluss der HDACs mit veränderter Expression in AML auf Tumorbilogie.....	103
Abbildung 41: HDAC-Expressionsveränderungen in AML Zellen und deren zellulären Auswirkungen, sowie ableitbare ergänzende HDAC-Inhibitor und Aktivator-Therapie.....	108

Abbildung 42: Monitoring von SIRT3 Bioaktivität im zellulären Energiemetabolismus mittels Biosensor-Chip System.....	116
Abbildung 43: Korrelation der einzelnen HDAC Expressionen mit AML Gruppen mit bestimmten zytogenetischen Aberrationen.....	153
Abbildung 44: Korrelation der HDAC6 Expression mit AML Gruppen mit bestimmten zytogenetischen Aberrationen. ....	154
Abbildung 45: Korrelation der HDAC9 Expression mit AML Gruppen mit bestimmten zytogenetischen Aberrationen. ....	154

**TABELLENVERZEICHNIS**

Tabelle 1:	Übersicht der Lokalisierung, Aktivität und Klasse der humanen Sirtuine.....	5
Tabelle 2:	Übersicht über HDAC Substrate, Lokalisierung.	6
Tabelle 3:	FAB-Klassifikation der AML	17
Tabelle 4:	WHO Klassifikation der AML.	18
Tabelle 5:	Überblick potentieller Gene und SNPs für pharmakogenetische Studien zum Ara-C Metabolismus	25
Tabelle 6:	Beispiel häufiger Chromosomenaberrationen bei AML mit rekrutierten HDACs.	27
Tabelle 7:	Übersicht der erworbenen oder zur Verfügung gestellten Plasmide.	31
Tabelle 8:	Übersicht der in der Arbeit hergestellten Plasmide.	32
Tabelle 9:	Übersicht der verwendeten Oligonukleotide.	32
Tabelle 10:	Sonden- / Zielsequenzen der SNP Analysen.	47-48
Tabelle 11:	AML Patientendaten der Genexpressionsanalysen (55 AML Patienten).	58
Tabelle 12:	Verteilung der zytogenetischen Aberrationen unter den AML-Subtypen.	67
Tabelle 13:	Analysierte HDACs mit den identifizierten nicht synonymen SNPs.	71
Tabelle 14:	Patientendaten der 279 AML Patienten der Klasse I HDAC SNP Analysen.	72
Tabelle 15:	Putative SIRT3 SNPs.	74
Tabelle 16:	CDA, DCK und DCTD Genotypen der 360 AML Patienten.	83
Tabelle 17:	Patientendaten der 360 AML Patienten der Analysen der Ara-C metabolisierenden Enzyme.	86
Tabelle 18:	Übersicht über HDAC Expressionsanalysen und Korrelationen mit Tumoren und AML	106 -107
Tabelle 19:	Signifikanzen (P-Werte) der AML-Subtypspezifischen HDAC Expressionsunterschiede.	156
Tabelle 20:	Signifikanzen (p-Werte) der Korrelation von HDAC Expressionsleveln und zytogenetischen Aberrationen.	156

**ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS**

AG	Arbeitsgruppe
AML	akute myeloische Leukämie
AP	Alkalische Phosphatase
APS	Ammoniumpersulfat
Ara-C	Cytarabin bzw. Arabinosyl-Cytosin
AS	Aminosäure
ATP	Adenosintriphosphat
bp	Basenpaar
BSA	Rinderserumalbumin ( <i>bovine serum albumine</i> )
°C	Grad Celsius
ca.	circa
cDNA	komplementäre DNA
CIP	Alkalische Phosphatase ( <i>calf intestine phosphatase</i> )
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CR	komplette Remission ( <i>complete remission</i> )
C-Terminus	Carboxyterminus
Da	Dalton
DMEM	<i>Dulbecco's modified eagle medium</i>
DMSO	Dimethylsulfoxid
DKFZ	Deutsches Krebsforschungszentrum
DNA	Desoxyribonukleinsäure (DNS)
dNTP	Desoxyribonukleotidtriphosphat
DTT	Dithiothreitol
<i>E. coli</i>	<i>Escherichia coli</i>
ECL	<i>enhanced chemiluminescence</i>
EGFP	grünfluoreszierendes Protein ( <i>enhanced green fluorescent protein</i> )
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
<i>et al.</i>	und andere
EtBr	Ethidiumbromid
FAB	„French American British“ Klassifikation der AML
FAM	Fluorescein
FBS	fötales Rinderserumalbumin ( <i>fetal bovine serum</i> )
FOXO	Forkhead Transkriptionsfaktoren
FRET	Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer
<b>g</b>	Erdbeschleunigung (9,81 m x s <sup>-2</sup> )
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
GTP	Guanosin-Triphosphat
<b>h</b>	Stunden ( <i>hours</i> )
dd H <sub>2</sub> O	zweifach destilliertes Wasser

H4Lys16	Histon H4 Lysin 16
HAT	Histonacetyltransferase
HCL	Salzsäure
HDAC	Histondeacetylase
HLA	humanes Leukozyten-Antigen
H-MAC	hochdosis Mitoxantron, Ara-C Therapie
HUSAR	„Heidelberg Unix Sequence Analysis Resources“
I-MAC	intermediäre Mitoxantron, Ara-C Therapie
iv	intravenös
<b>k</b>	kilo ( $10^3$ )
kb	Kilobasenpaar
kg	Kilogramm
KI	Kurzinfusion
<b>l</b>	Liter
$\lambda$	Wellenlänge (nm)
LB	Luria Bertani
<b>M</b>	molar (Mol pro Liter)
MDS	Myelodysplastische Syndrom
$\mu$	mikro ( $10^{-6}$ )
m	Meter oder milli ( $10^{-3}$ )
m <sup>2</sup>	Quadratmeter
MAMAC	Amsakrin und Ara-C (Therapie)
MAV	Mitoxantron und Ara-C (Therapie)
mg	milligramm
min	Minuten
MW	Molekulargewicht
<b>n</b>	nano ( $10^{-9}$ )
NaCl	Natriumchlorid
NADH	Nikotinamidadenindinukleotid
NAM	Nikotinamid
nm	Nanometer
NP-40	4-Nonylphenolpolyethylenglykol (Nonidet P-40)
N-Terminus	Aminoterminal
OD	optische Dichte
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	Phosphat-gepufferte Kochsalzlösung ( <i>phosphate buffered saline</i> )
PBSCT	Stammzelltransplantation
PCR	Polymerase-Kettenreaktion ( <i>polymerase chain reaction</i> )
pH	Konzentration der H <sup>+</sup> -Ionen in einer Lösung
<b>p</b>	piko ( $10^{-12}$ )
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid

RNA	Ribonukleinsäure (RNS)
rpm	Umdrehungen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Nährmedium
RT	Raumtemperatur
s.	siehe
s.o.	siehe oben
SDS	Natriumdodecylsulfat ( <i>sodium dodecyl sulfate</i> )
sek	Sekunden
sir2	silent information regulator 2
SIRT	Sirtuin
SOC	<i>super optimal culture</i> (-Medium)
Taq Polymerase	DNA-abhängige DNA-Polymerase aus <i>Thermus aquaticus</i>
TBS	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
TBS/T	Tris-gepufferte Kochsalzlösung mit Tween-20
TEMED	N, N, N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Trishydroxymethylaminomethan
TSA	Trichostatin
U	Unit
u.a.	und andere
ü.N.	über Nacht
V	Volt
VP 16	Etoposid
v/v	Volumeneinheit pro Volumeneinheit ( <i>volume per volume</i> )
WT	Wildtyp
w/v	Gewichtseinheit pro Volumeneinheit ( <i>weight per volume</i> )
z.T.	zum Teil

### Kurzschreibweise der Aminosäuren

<b>A / Ala</b> / Alanin	<b>M / Met</b> / Methionin
<b>C / Cys</b> / Cystein	<b>N / Asp</b> / Asparagin
<b>D / Asp</b> / Asparaginsäure	<b>P / Pro</b> / Prolin
<b>E / Glu</b> / Glutaminsäure	<b>Q / Gln</b> / Glutamin
<b>F / Phe</b> / Phenylalanin	<b>R / Arg</b> / Arginin
<b>G / Gly</b> / Glycin	<b>S / Ser</b> / Serin
<b>H / His</b> / Histidin	<b>T / Thr</b> / Threonin
<b>I / Ileu</b> / Isoleucin	<b>V / Val</b> / Valin
<b>K / Lys</b> / Lysin	<b>Y / Tyr</b> / Tyrosin
<b>L / Leu</b> / Leucin	<b>W / Trp</b> / Tryptophan

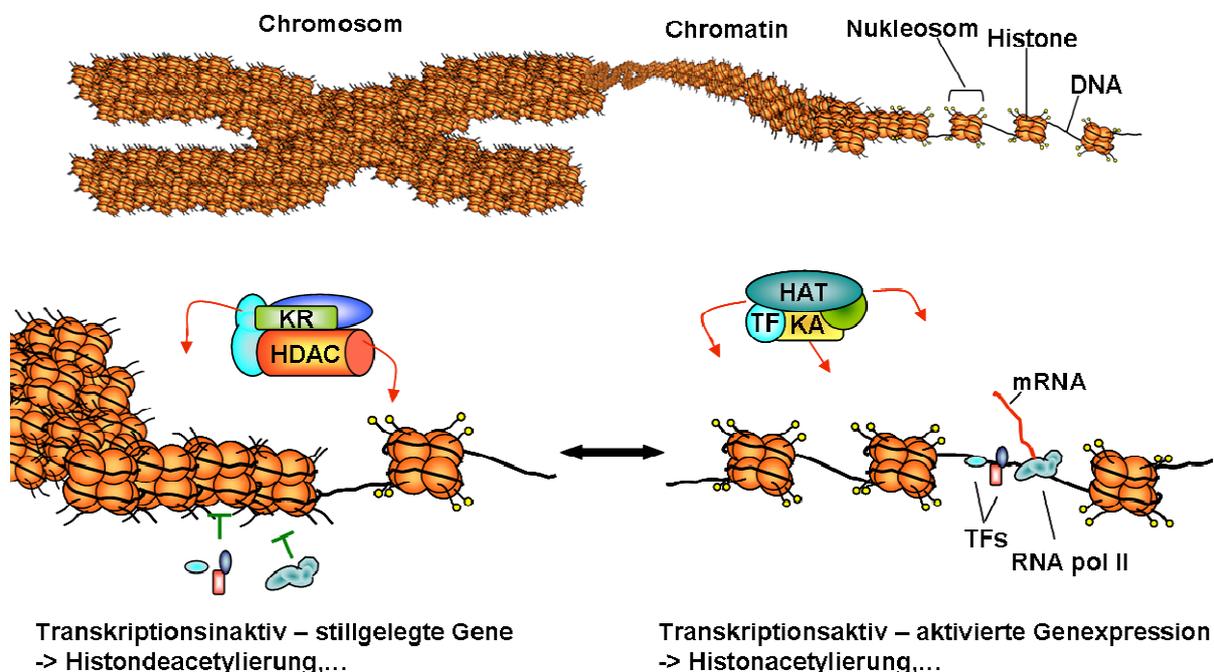
# 1 Einleitung

## 1.1 Epigenetik

Epigenetik beschäftigt sich mit vererbaren Veränderungen der Genexpression, die ohne eine Veränderung der DNA Sequenz auftreten (Wolffe and Matzke 1999), sondern auf DNA Methylierung und unterschiedlichen posttranslationalen Histon-Modifikationen, wie Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung, Sumoylierung und Ubiquitinierung beruhen, welche im Gegensatz zu genetischen Veränderungen reversibel sind und in ihrer Gesamtheit als Epigenom bezeichnet werden (Biel, *et al* 2005, Sharma, *et al*).

Die meisten dieser vererbaren Veränderungen werden während der Differenzierung etabliert und bleiben über mehrere Zellteilungen stabil und ermöglichen den Zellen spezifische Differenzierungen trotz gleicher genetischer Information.

Die epigenetische Regulation der Genexpression kann in eine globale, großflächige (Abbildung 1, 1.1.1) und eine spezifischere auf einzelne Gene und Transkriptionsfaktoren bezogene Regulation (1.1.2) differenziert werden.



**Abbildung 1: Übersicht globaler epigenetischer Regulation am Beispiel des Acetylierungsgrads.**  
KR = Ko-Repressor, KA = Ko-Aktivator, TF = Transkriptionsfaktor. [eigene Abbildung]

### 1.1.1 Chromatinremodeling - globale epigenetische Genregulation

Die kleinste (wichtigste) Einheit des Chromatins ist das Nukleosom, ein Komplex bestehend aus zwei Histon H3 und H4 Heterodimeren und zwei H2A und H2B Heterodimeren, um welches sich 146bp der DNA 1,75 mal herum winden (Arents, *et al* 1991, Luger, *et al* 1997). Neben der DNA Methylierung erfolgen die beschriebenen epigenetischen Mechanismen zur Veränderung der Chromatinstruktur (1.1) über Modifikationen dieser Histonkomplexe bzw. deren Histonschwänze, wodurch die lokale Chromatinstruktur, der Packungsgrad und Zugänglichkeit für die Transkriptionsmaschinerie verändert wird (Abbildung 1). Die Gesamtheit dieser Modifikationen wird als „Histon-Kode“ bezeichnet (Jenuwein and Allis 2001).

Von den epigenetischen Modifikationen der Histone ist der Transfer oder die Entfernung von Acetyl-Gruppen von der  $\epsilon$ -Aminogruppe der Lysinreste der Histon(schwänze)-Enden der Nukleosome durch Histon-Acetyltransferasen (HATs) und Histon-Deacetylasen (HDACs) (1.1.3) neben der Modifikation durch Histon-Methyltransferasen (HMTs) und Demethylasen (HDMs) am besten charakterisiert und stellt die Haupt post-translationale Histonmodifikation dar (Botrugno, *et al* 2009, Kouzarides 2007).

#### 1.1.1.1 Histon-Acetylierungsgrad

Für die Transkriptionsmaschinerie stellt der Verpackungsgrad der DNA die größte Hürde beim Zugang zur DNA dar und es ist schon lange bekannt, dass der Acetylierungsgrad eine entscheidende Rolle bei der Transkriptionsregulation spielt (Grunstein 1997) und veränderte HDAC Funktionen wurden schon in zahlreichen Studien bei Krebs nachgewiesen (Cress and Seto 2000) (1.1.4).

Während die HDACs Acetylgruppen entfernen, werden sie von Histon-Acetyltransferasen an Lysinreste transferiert, wobei ein ausgeglichenes Zusammenspiel dieser Antagonisten ein Gleichgewicht zwischen Acetylierung und Deacetylierung des Chromatins sicherstellt. Eine verstärkte Aktivität der HDACs führt zu Hypoacetylierung der Histone und resultiert in einer sehr dicht gepackten, kondensierten Form der DNA, dem Heterochromatin, welches für Transkriptionsfaktoren (TFs) unzugänglich und somit transkriptionsinaktiv ist (Abbildung 1). Demgegenüber führt übermäßige HATs Aktivität zu Hyperacetylierung der Histone, was mit einer transkriptionsaktiven, offenen DNA Struktur einhergeht. Dabei neutralisieren die Acetylgruppen die positive Ladung des basischen Histonschwanzes, so dass die elektrostatischen Wechselwirkungen zwischen dem negativ geladenem Phosphatrückgrad und den Histonen geschwächt wird und es zu der gelockerten, offenen Struktur kommt und Transkriptionsfaktoren Zugang zu ihren Zielpromotoren haben (Grunstein 1997).

Während es demnach durch HDAC Inhibition zur Transkriptionsaktivierung kommt, kann diese aber auch zu einer Repression führen (Glaser, *et al* 2003), was auf eine Unterscheidung zwischen globalen Effekten auf Histone und spezifischen, lokalen Effekte (1.1.2) auf bestimmte Promotoren hinweist (wie auch beim Methylierungsgrad).

### **1.1.1.2 DNA- und Histon-Methylierung**

DNA Methylierung durch DNA-Methyltransferasen (DNMTs) erfolgt beim Menschen (Säu-  
gern) primär an CpG Dinukleotidpaaren, in denen ein 5´Cytosinrest neben einem Guaninrest  
liegt. Die Hypermethylierung von CpG-reichen Promotoren inaktiviert die Genexpression und  
kann zur Inaktivierung der Expression von Tumorsuppressorgenen führen, was in vielen hu-  
manen soliden Tumoren (Baylin and Herman 2000, Goel, *et al* 2004, Lindsey, *et al* 2006,  
Maruyama, *et al* 2004) und hämatologischen Neoplasien (Muller, *et al* 2006) wie auch der  
AML (Claus, *et al* 2005) nachgewiesen wurde (zusammengefasst in (Mund, *et al* 2006)).

Dabei kann die Expressionsinaktivierung durch die DNA Methylierung auf einer Verände-  
rung der Bindestellen für Transkriptionsfaktoren oder die Ermöglichung der Bindung von  
Proteinen erfolgen, die eine Inaktivierung durch Interaktion mit HDACs bewirken (Sharma, *et*  
*al*).

Im Gegensatz zur DNA-Methylierung können Histonmodifikationen sowohl zur Aktivierung,  
als auch zur Inaktivierung führen, in Abhängigkeit von der Art und Ausmaß der Modifikatio-  
nen und an welchem „Rest“ bzw. Stelle der Histonenden die Modifikation erfolgt (Sharma, *et*  
*al*).

Die Histon-Methylierung wirkt z.B. aktivierend im Falle einer Trimethylierung von Lysin 4  
am Histon H3 (Liang, *et al* 2004), wohingegen eine Trimethylierung von H3 Lysin 9 oder  
Lysin 27 zur Inaktivierung führt (Kouzarides 2007). Die Histonposition H3-K9 kann dabei  
sowohl acetyliert (Aktivierung) als auch methyliert (Inaktivierung) werden (Biel, *et al* 2005).

## **1.1.2 Lokal spezifische epigenetische Genregulation**

Neben der globalen Regulation der Genexpression über den Packungsgrad der DNA (Chro-  
matinremodeling) kann auch die lokale Expression von Genen über die Acetylierung oder  
Deacetylierung von Transkriptionsfaktoren beeinflusst werden und es sind mittlerweile eine  
Vielzahl an nicht Histon Substraten für HDACs und HATs identifiziert (siehe 1.1.3.3).

Dabei kann die Deacetylierung über Inaktivierung der Proteine bzw. Transkriptionsfaktoren  
(z.B. p53 welcher durch SIRT1 Deacetylierung inaktiviert (Luo, *et al* 2001)) die Expression

deren Zielgene beeinflussen, wobei je nachdem ob ein Aktivator oder Repressor gehemmt wird, entsprechend die Expression der Zielgene gehemmt oder gesteigert werden kann.

Deacetylierung kann aber auch aktivierende Wirkung auf Proteine haben (z.B. Acetyl-CoA durch SIRT3 (Hallows, *et al* 2006)) (1.1.3.2).

Eine weitere Möglichkeit besteht in der Regulation der Lokalisierung von Zielproteinen bzw. Transkriptionsfaktoren. So wird zum Beispiel durch Deacetylierung des Forkhead Transkriptionsfaktors FoxO1 durch SIRT1 die Expression von FoxO1 Zielgenen gesteigert, indem deacetyliertes FoxO1 im Zellkern zurückgehalten wird (Frescas, *et al* 2005).

### 1.1.3 Histon-Deacetylasen

Histon-Deacetylasen (HDACs) deacetylieren nicht nur Histone, sondern zahlreiche nicht Histon Proteine und besitzen viele zentrale Schlüsselfunktionen (1.1.3.3), wobei sie meist in Multiproteinkomplexen agieren.

HDACs sind evolutionär hoch konserviert (Verdin, *et al* 2003) und die 18 humanen HDACs werden aufgrund ihrer strukturellen, funktionellen und Sequenzhomologien phylogenetisch in vier Klassen (Gregoretto, *et al* 2004) eingeteilt.

#### 1.1.3.1 Klasse I, II und IV HDACs

Die Klasse I HDACs mit Homologie zu dem Hefeprotein Rpd3 (reduced potassium dependency 3) besteht aus HDAC 1, 2, 3 und 8. Sie sind meist im Zellkern lokalisiert, eher klein (40-55 kDa) und ubiquitär exprimiert (Emiliani, *et al* 1998, Hu, *et al* 2000, Yang, *et al* 1997)

Die Klasse II HDACs mit Homologie zum Hefeprotein Hda1 (Histon-Deacetylase 1) beinhaltet HDAC 4, 5, 7, 9 (IIa) und 6 und 10 (IIb), sind etwas größer (100-130 kDa) und werden gewebsspezifisch exprimiert (mit Ausnahme von HDAC10, die auch fast ubiquitär exprimiert wird) und sind im Zellkern und Zellplasma lokalisiert (Fischer, *et al* 2002, Fischle, *et al* 2001, Fischle, *et al* 1999, Gao, *et al* 2002, Grozinger, *et al* 1999, Guardiola and Yao 2002, Kao, *et al* 2000, Kao, *et al* 2002, Tong, *et al* 2002, Verdel and Khochbin 1999).

Klasse I und II HDACs besitzen eine hoch konservierte Domäne aus etwa 390 Aminosäuren und unterscheiden sich jedoch in Größe und Zusammensetzung.

HDAC 11 bildet eine weitere Klasse (IV), weil HDAC11 sowohl Sequenzhomologien zu Klasse I als auch zu Klasse II HDACs aufweist (Gao, *et al* 2002, Gregoretto, *et al* 2004, Voelter-Mahlknecht, *et al* 2005).

Die Klasse I, II und IV HDACs stellen die klassischen HDACs da, welche über einen Zink-basierende Katalyse-Mechanismus agieren, um Acetylgruppen von Lysinresten über ein La-

dungsausgleich System abzutrennen, wobei das Zinkion die Acetamidbindung schwächt und den hydrolytischen Angriff der Wassermoleküle erleichtert (Finnin, *et al* 1999).

### 1.1.3.2 Klasse III HDACs - Sirtuine

Die Klasse III HDACs, die Sirtuine besitzen Homologie zum Hefeprotein Sir-2 und bestehen aus 7 Mitgliedern (Blander and Guarente 2004). Aufgrund von Sequenzhomologien werden Sirtuine in vier Unterklassen gegliedert (Frye 2000) (Tabelle 1).

Sirtuine kommen in allen Zellkompartimenten vor (Tabelle 1) und unterscheiden sich von den anderen HDACs durch eine  $\text{NAD}^+$ -abhängige Deacetylierungs- und ADP-ribosyltransferase Aktivität (Blander and Guarente 2004), wobei das aktive Zentrum der Sirtuine aus 275 Aminosäuren besteht und  $\text{NAD}^+$  als Kofaktor benötigt (Imai, *et al* 2000).

**Tabelle 1: Übersicht der Lokalisierung, Aktivität und Klasse der humanen Sirtuine.**

Alle Sirtuine mit Deacetylase Aktivität haben auch ADP-ribosyltransferase Aktivität. (Frye 2000, Nakagawa and Guarente 2009, Vakhrusheva, *et al* 2008, Yamamoto, *et al* 2007)

<b>Sirtuin</b>	<b>Lokalisierung</b>	<b>Aktivität</b>	<b>Klasse</b>
<b>SIRT1</b>	Zellkern	Deacetylase	I
<b>SIRT2</b>	Zytoplasma	Deacetylase	I
<b>SIRT3</b>	Mitochondrium (Matrix) (ZK)	Deacetylase	I
<b>SIRT4</b>	Mitochondrium (Matrix)	ADP-ribosyl Transferase	II
<b>SIRT5</b>	Mitochondrium (Matrix)	Deacetylase	III
<b>SIRT6</b>	Zellkern	ADP-ribosyl Transferase	IV
<b>SIRT7</b>	Zellkern (Nukleoli)	Deacetylase	IV

### 1.1.3.3 HDAC und SIRTUIN-Substrate und zelluläre Funktionen

Wie beschrieben, kommen HDACs und speziell Sirtuine nicht nur im Zellkern, sondern allen Zellkompartimenten vor und besitzen viele „nicht-Histon-Proteine“ als Substrate und Interaktionspartner (Tabelle 1, Tabelle 2), wie z.B. Transkriptionsfaktoren (TF) wie p53 (Ito, *et al* 2002, Vaziri, *et al* 2001), TFs der FOXO-Familie (Brunet, *et al* 2004, Motta, *et al* 2004), oder Zytoskelett Proteine wie Tubulin (Hubbert, *et al* 2002) und viele andere, von denen die wichtigsten in einer Übersicht in Tabelle 2 dargestellt sind.

**Tabelle 2: Übersicht über HDAC Substrate, Lokalisierung**

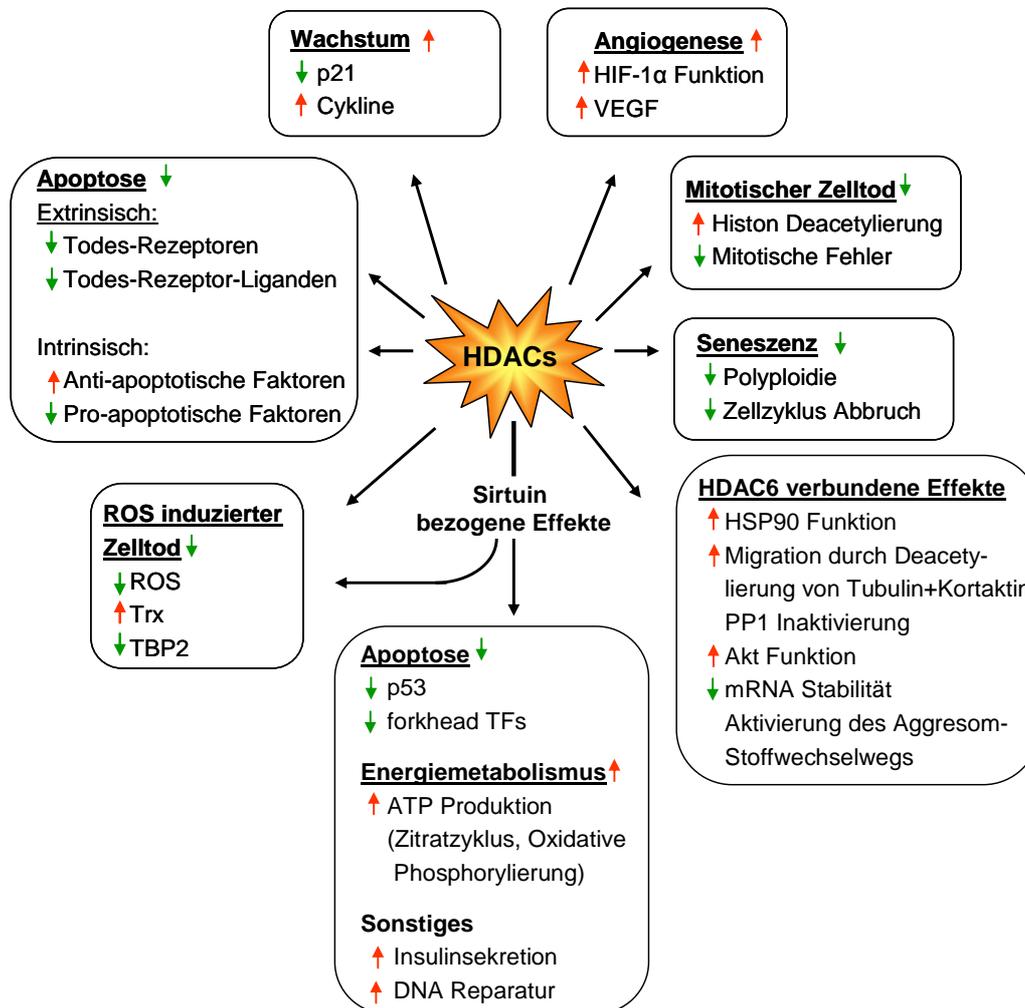
(Carew, et al 2008, Nakagawa and Guarente 2009, Vakhrusheva, et al 2008, Villagra, et al 2009, Yamamoto, et al 2007).

<b>HDACs</b>	<b>Lokalisierung</b>	<b>Substrate (Auswahl)</b>
<b>Klasse I</b>		
HDAC1	Zellkern	Androgen Rezeptor P53, MyoD, E2F-1 SHP, Stat3
HDAC2	Zellkern	Glukokortikoid Rezeptor Bcl-6, Stat3
HDAC3	Zellkern	RelA, GATA-1, SHP, Stat3
HDAC8	Zellkern	
<b>Klasse IIa</b>		
HDAC4	Zellkern/Zytoplasma	GATA-1, GCMA, HP-1
HDAC5	Zellkern/Zytoplasma	Smad7, GCMA, HP-1
HDAC7	Zellkern/Zytoplasma	Plag1/Plag2
HDAC9	Zellkern/Zytoplasma	
<b>Klasse IIb</b>		
HDAC6	Zytoplasma (meist)	$\alpha$ -Tubulin, Hsp90, SHP Smad7
HDAC10	Zytoplasma (meist)	
<b>Klasse IV</b>		
HDAC11	Zellkern/Zytoplasma	(Interleukin10 Expression)
<b>Klasse III</b>		
SIRT1	Zellkern	p53, FOXO, NF- $\kappa$ B PGC-1 $\alpha$
SIRT2	Zytoplasma	Histon H4, $\alpha$ -Tubulin
SIRT3	Mitochondrien (meist)	Acetyl-CoA Synthetase FOXO, Komplex I, II (UE)
SIRT4	Mitochondrien	Glutamat Dehydrogenase
SIRT5	Mitochondrien	CPS 1
SIRT6	Zellkern	DNA Polymerase B
SIRT7	Zellkern	RNA Polymerase I, p53

Entsprechend der Vielzahl an Substraten (Buchwald, *et al* 2009, Stimson and La Thangue 2009) besitzen HDACs auch vielfältige zelluläre Funktionen der Regulation des Zellzyklus, Transkription, Differenzierung, Energiemetabolismus, Abwehr von reaktiven Sauerstoffspezies, Angiogenese und Apoptose (Bolden, *et al* 2006, Minucci and Pelicci 2006), was in Abbildung 2 in einer Übersicht dargestellt ist. Es ist weiterhin bekannt, dass die Fehlregulierung von HDACs an der Tumorentstehung und Progression beteiligt ist (1.1.4). (Cress and Seto 2000, Lin, *et al* 1998, Mahlknecht and Hoelzer 2000, Marks, *et al* 2001a)).

HDACs, speziell Klasse I und II HDACs, sind meistens Teil von Multiproteinkomplexen, deren andere Mitglieder sowohl die HDAC Aktivität regulieren, als auch die Führung des Komplexes zu den entsprechenden Zielen bzw. Zielsequenzen übernehmen (Sengupta and Seto 2004), wie z.B. in Korepressor-Komplexen mit SMRT/N-CoR und mSin3A (Alland, *et al* 1997, Heinzel, *et al* 1997, Kao, *et al* 2000). In diesem Zusammenhang spielen speziell Klasse

I HDACs in der Pathogenese von Akuter myeloischer Leukämie eine zentrale Rolle (vgl. 1.4.1).



**Abbildung 2: Übersicht der wichtigsten Funktionen von HDACs und beeinflusster zellulärer Vorgänge.** HIF-1 $\alpha$  = Hypoxie induzierter Faktor-1 $\alpha$ , HSP90 = Hitzeschockprotein 90, PP1 = Proteinphosphatase 1, ROS = reaktive Sauerstoffspezies, Trx = Thioredoxin, TBP2 = Trx Bindefaktor, VEGF = Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor; HDAC I, II Referenzen (Blackwell, *et al* 2008, Bolden, *et al* 2006, Dokmanovic, *et al* 2007, Ellis, *et al* 2009, Glozak and Seto 2007, Jones and Baylin 2007, Kim, *et al*, Minucci and Pelicci 2006, Moradei, *et al* 2008, Rasheed, *et al* 2007, Xu, *et al* 2007) Sirtuin Referenzen (Brunet, *et al* 2004, Shi, *et al* 2005, van Leeuwen and Lain 2009)

Während die meisten dieser Funktionen (Abbildung 2) anfänglich nur Klasse I und II HDACs zugeschrieben wurden, sind entsprechende Funktionen mittlerweile auch für Sirtuine nachgewiesen. So spielen auch Sirtuine zentrale Funktionen bei der Differenzierung (Li, *et al* 2007), Zellzyklus und Chromosomenstabilität (Brachmann, *et al* 1995, Dryden, *et al* 2003), Apoptose (Vaziri, *et al* 2001) und Resistenz zu metabolischen Stress (Brunet, *et al* 2004, Luo, *et al* 2001, Vaziri, *et al* 2001) (1.1.3.5). Des Weiteren besitzen sie Schlüsselfunktionen im Energiemetabolismus (Chaudhary and Pfluger 2009) (1.1.3.5) und der Pathogenese von Krebs

(van Leeuwen and Lain 2009) (1.1.4) und degenerativen Krankheiten (Law, *et al* 2009, Pallas, *et al* 2009) und gewinnen daher mehr und mehr Beachtung bei der Entwicklung neuer epigenetischer Medikamente (Dali-Youcef, *et al* 2007, Jiang 2008, Michan and Sinclair 2007). Nach SIRT1, dem meist analysierten Sirtuin, gewinnt dabei auch speziell SIRT3 mehr und mehr an Bedeutung (1.1.3.4).

#### **1.1.3.4 SIRT3 – Hauptdeacetylase der Mitochondrien**

SIRT3 ist wie SIRT4 und 5 eine mitochondriale Deacetylase, wobei SIRT4 keine und SIRT5 nur geringe Deacetylaseaktivität aufweist (North, *et al* 2003) und somit SIRT3 die Hauptdeacetylase der Mitochondrien darstellt (Ahn, *et al* 2008, Lombard, *et al* 2007, Onyango, *et al* 2002). Mitochondrien sind zentrale Organellen des zellulären Energiemetabolismus und Prozessen der Apoptose und zellulärer Seneszenz (Balaban, *et al* 2005, Chan 2006).

SIRT3 wird beim Import in die mitochondriale Matrix durch Prozessierung durch die Matrixprozessierende-Peptidase (MPP) aktiviert (Abbildung 25), welche den N-terminus entfernt und SIRT3 in die kürzere, 28 kDa große Isoform überführt (Schwer, *et al* 2002).

SIRT3 besitzt zentrale Funktionen bei der Stressantwort (Scher, *et al* 2007, Sundaresan, *et al* 2008), sowie der Apoptose (Allison and Milner 2007, Sundaresan, *et al* 2008), Zellzyklus Regulation (Allison and Milner 2007) und besonders im Energiemetabolismus und der Abwehr reaktiver Sauerstoffspezies (1.1.3.5) (Ahn, *et al* 2008, Schlicker, *et al* 2008, Schwer, *et al* 2006, Shi, *et al* 2005).

Neuere Studien deuten darauf hin, dass SIRT3 und SIRT1 mit dem Hitzeschockprotein HSP70 interagieren (Law, *et al* 2009), welches wiederum eine Rolle in altersbezogenen Krankheiten wie Parkinson, Alzheimer und Huntington spielt (Soti and Csermely 2002) und Schutzfunktionen bei Hitze, Kälte, Proteinentfaltung und oxidativem Stress besitzt (Pierpaoli 2005). Als weitere Schutzfunktion unter Stress deacetyliert SIRT3 an Ku70, was dessen Interaktion mit dem proapoptotischen Protein Bax induziert, wodurch dessen Translokation zu den Mitochondrien verhindert wird (Sundaresan, *et al* 2008).

Proteomanalysen zeigten weiterhin, dass 20 % der mitochondrialen Proteine, darunter auch viele metabolische Enzyme, acetyliert sind und entsprechend alle putative Substrate von SIRT3 darstellen, da SIRT3 die Hauptdeacetylase in Mitochondrien ist und ein Ausschalten von SIRT3, zu globaler mitochondrialer Hyperacetylierung führte (Kim, *et al* 2006, Lombard, *et al* 2007). Weiterhin zeigten jüngste Studien, dass SIRT3 über Deacetylierung des mitochondrialen, ribosomalen Proteins MRPL10 die mitochondriale Proteinsynthese reguliert

(Yang, et al 2009). Entsprechend scheint SIRT3 also auch bei der mitochondrialen Homöostase eine zentrale Rolle zu spielen.

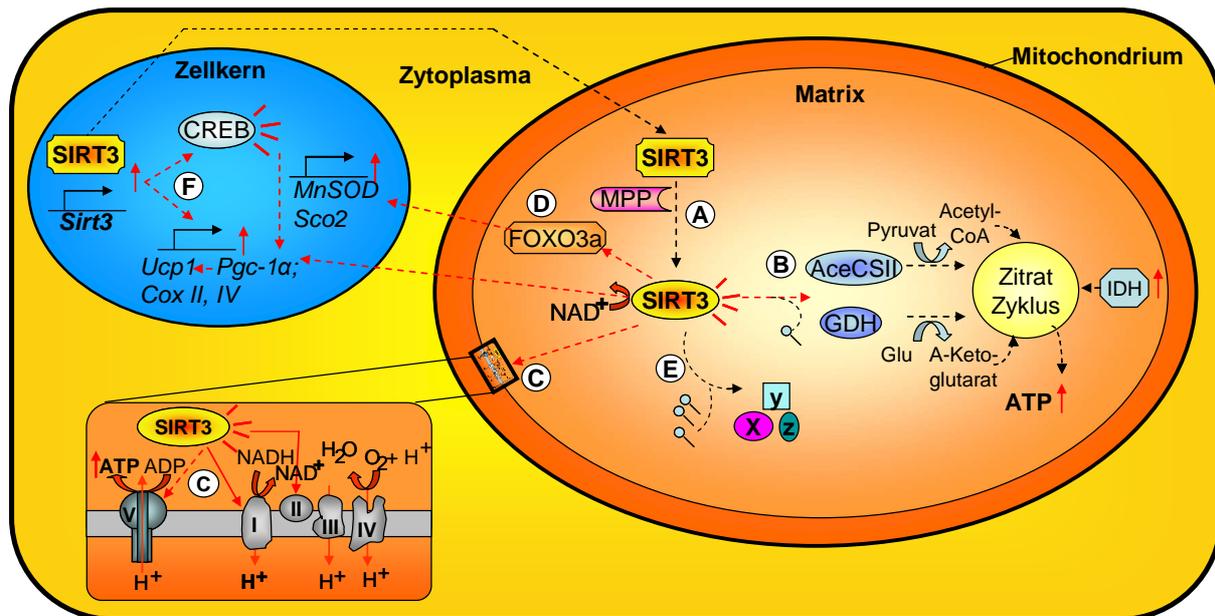
Da optimal funktionierende Mitochondrien essentiell sind für eine ausreichende Energieversorgung der Zelle und multiple biosynthetische Stoffwechselwege, ist die Aufrechterhaltung der mitochondrialen Homöostase sehr wichtig für das Zellüberleben und ein Ungleichgewicht in der Produktion oder Abbau von mitochondrialen Komponenten oder deren Fehlregulation könnte zu mitochondrialer Dysfunktion bis hin zum Zelltod führen (Bota and Davies 2001).

### **1.1.3.5 Sirtuine - SIRT3 - im Energiemetabolismus**

Nachdem den Sirtuinen anfänglich allein aufgrund ihrer NAD-Abhängigkeit eine Rolle als Sensoren des Energiezustands der Zellen zugeschrieben wurde, sind bis heute viele zentrale Schlüsselfunktionen bei der Regulation des Energiemetabolismus aufgedeckt worden (Yu and Auwerx 2009).

Dabei besitzt von allen Sirtuinen SIRT3 die bedeutendste Rolle Abbildung 3. So kann SIRT1 den zellulären Metabolismus zwar indirekt über Regulation der Genexpression mitochondrialer Gene wie UCP2 und 3 (Amat, *et al* 2007, Bordone, *et al* 2006) und PGC1 (Rodgers, *et al* 2008) beeinflussen, aber SIRT3 hingegen scheint zum einen ebenfalls solche indirekten Regulationswege zu besitzen, da gezeigt wurde, dass SIRT3 die Expression von Cytochrom-c-Oxidase ((cox) Untereinheiten II und IV), sowie über den Transkriptionsfaktor CREB (cAMP response element-binding protein) auch PGC-1 $\alpha$  (peroxisome proliferator-activated receptor  $\gamma$ ), und UCP1 (uncoupling protein 1) steigern kann (Shi, *et al* 2005). Zum anderen wurde gezeigt, dass SIRT3 auch direkte aktivierende Effekte auf die Komplexe I (Ahn, *et al* 2008), II (Cimen, *et al*) der Atmungskette besitzt (Abbildung 3). Außerdem deuten weitere Studien auf eine direkte Aktivierung einer Untereinheit des Komplex V durch SIRT3 hin (Law, et al 2009).

Aufgrund dieser Funktionen erklärt sich die durch SIRT3 induzierbare Steigerung der Respiration und des mitochondrialen Membranpotentials und der Reduktion Menge an reaktiven Sauerstoffspezies (ROS), was den Effekt der Kalorienrestriktion auf den Zellmetabolismus nachahmt (Shi, *et al* 2005).



**Abbildung 3: Rolle von SIRT3 im zellulären Energiemetabolismus.**

A) SIRT3 wird durch Prozessierung aktiviert. B) SIRT3 Überexpression führt zu, Anstieg der Konzentration von  $\alpha$ -Ketoglutarat und Acetyl-CoA für den Zitrat Zyklus, C) zu einer verstärkten direkten Aktivierung der mitochondrialen Atmungskette über Deacetylierung von Komplex I und II (und V), sowie F) indirekt z.B. durch Steigerung der Expression von Komplex IV (cox). D) Über FOXO3a steigert SIRT3 die Expression von MnSOD und SCO2. E) Mit 20 % acetylierter Proteine in Mitochondrien gibt es viele weitere putative SIRT3 Substrate. (Referenzen siehe Text) (eigene Darstellung, (Dransfeld, *et al*)

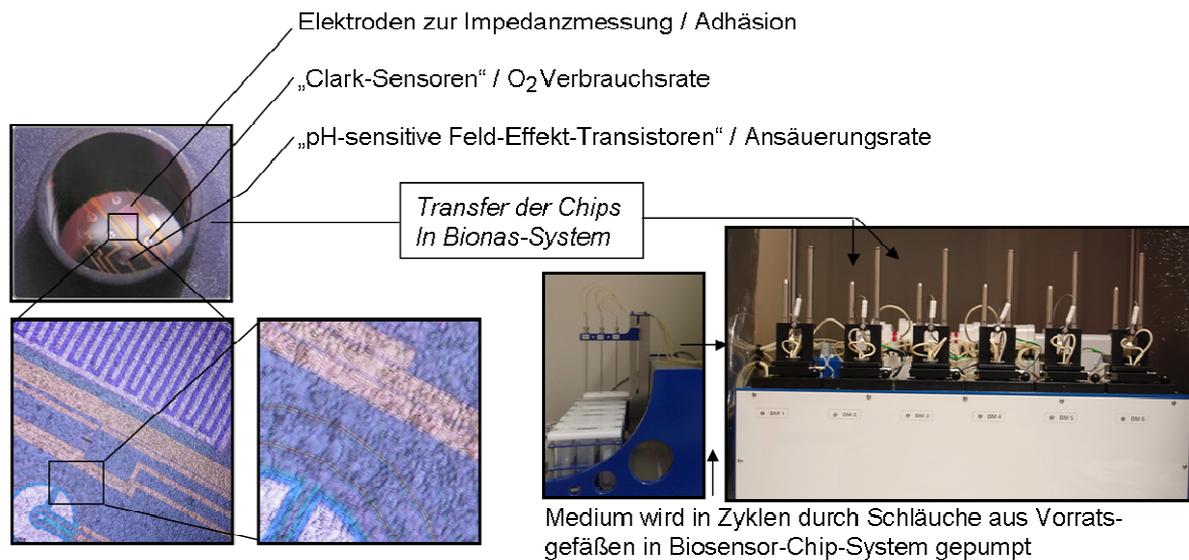
Weiterhin beeinflusst SIRT3 den Energiemetabolismus zusätzlich über einen Anstieg der ATP Synthese durch Aktivierung der mitochondrialen Acetyl-CoA-Synthetase (Hallows, *et al* 2006, Schwer, *et al* 2006) und Glutamat Dehydrogenase (GDH), indem vermehrt Aminosäuren in den Citratzyklus und die Glukoneogenese eingespeist werden (Lombard, *et al* 2007, Schlicker, *et al* 2008), sowie die durch Aktivierung der Isocitrat-Dehydrogenase (Schlicker, *et al* 2008), welche die Regeneration von Antioxidanzien fördert und einen Schlüsselpunkt des Citratzyklus reguliert.

In Analogie zu SIRT1 interagiert SIRT3 außerdem mit der mitochondrialen Isoform von FOXO3a, wodurch die Expression von MnSOD (Mangan Superoxiddismutase) und SCO2 (Synthese der Cytochrom C Oxidase) gesteigert wird (Abbildung 3) (Jacobs, *et al* 2008, Schwer, *et al* 2006), was entsprechend zu einer weiteren Stärkung der ROS Abwehr und Respiration führt.

### 1.1.3.6 Online Monitoring des zellulären Energiestoffwechsels mittels Biosensor-Chip System

In Zusammenhang mit Analysen zu SIRT3 und dem Energiemetabolismus (3.3.4) wurden im Rahmen dieser Arbeit neben vielen molekularbiologischen und biochemischen Standardmethoden auch eine spezielle, seltene Methode zur Untersuchung des zellulären Energiestoffwechsels mittels eines Biosensor-Chip Systems eingesetzt.

Das „Bionas-System“, ein „Biosensor-Chip-Analyse System“, stellt ein innovatives Tool zum realtime *in vitro* monitoring von metabolischen Parametern wie Glykolyse, Zellatmung und Adhäsion dar (Thedinga, *et al* 2007). Dies wird ermöglicht durch Messung der extrazellulären Ansäuerungsrate über pH-sensitive Sensoren, die Messung des zellulären Sauerstoffverbrauchs über spezielle „Clark-Sensoren“ und der Erfassung der Zellimpedanz mit speziellen „IDES“ Sensoren (interdigitated electrode structures) (Ceriotti, *et al* 2007).



**Abbildung 4:** Schema zum „realtime online monitoring“ des zellulären Metabolismus mit Biosensor-Chip-System (Bionas System).

Der Vorteil der Methode besteht unter anderem darin, dass die Analysen im Gegensatz zu Endpunktanalysen in lebenden Zellen über einen längeren Zeitraum (Kinetiken) durchgeführt werden können, was durch die Messung der genannten metabolisch relevanten Parametern ermöglicht wird, die für nicht invasive Messungen mittels der Messelektroden und Sensoren zugänglich sind.

### 1.1.4 HDACs und Krebs

Aufgrund der beschriebenen globalen Regulationsfunktionen (1.1.1, Abbildung 1) und Schlüsselfunktionen von HDACs in vielen Signalwegen und zellulären Vorgängen (wie z.B. Zellproliferation, Differenzierung und Apoptose, 1.1.3.3, Abbildung 2) ist es nicht verwunderlich, dass eine Fehlregulierung von HDACs und des Acetylierungsgrads eine zentrale Rolle in der Pathogenese und Progression von Tumoren spielt, wobei epigenetische und genetische Veränderungen zusammenwirken (Di Gennaro, *et al* 2004, Jones and Baylin 2007, Kelly, *et al* 2002)).

Es ist nicht nur bekannt, dass die HDAC Expression in Tumoren verändert ist (besonders Klasse I HDACs meist erhöht), sondern es wurden zahlreiche Korrelationen der HDAC Expressionen mit Therapieansprechen und Prognose aufgedeckt, wobei die Rolle der einzelnen HDACs (und Identifikation der Hauptverantwortlichen) noch weiter diskutiert und analysiert wird (zusammengefasst in (Weichert 2009, Witt, *et al* 2009) (vgl. 4.1.5)).

Während Sirtuine dabei lange Zeit vernachlässigt wurden, wird deren Rolle bei Tumorentstehung ebenfalls immer deutlicher, da auch sie unter anderem wichtige Tumor Supressoren deacetylieren und ihre Aktivität beeinflussen, wie z.B. p53 (durch SIRT1 inhibiert (Vaziri, *et al* 2001)). Außerdem zeigen Studien auch, dass andauernde Hemmung von SIRT1 zu genomischer Instabilität führt und SIRT1 somit als Tumor Supressor wirken kann (van Leeuwen and Lain 2009).

Wie für Klasse I und II HDACs wurden auch für Sirtuine veränderte Expressionen in verschiedenen Tumorarten nachgewiesen (z.B. SIRT1 und SIRT3 (Ashraf, *et al* 2006, Bradbury, *et al* 2005, Jung-Hynes, *et al* 2009), für SIRT2 mit Gliomen (Hiratsuka, *et al* 2003) und SIRT7 mit Schilddrüsen-Krebs (de Nigris, *et al* 2002, Frye 2002)). Am Beispiel von Brustkrebs wurden SIRT7 und SIRT3 sogar als prognostische Marker diskutiert, da SIRT7 und besonders SIRT3 in metastasierendem Brustkrebs signifikant hoch reguliert werden, in nicht metastasierendem Brustkrebs jedoch nur SIRT7 (Ashraf, *et al* 2006).

Eine besondere Rolle in der Pathogenese und Therapie spielen HDACs speziell bei hämatologischen Neoplasien wie der Akuten Myeloischen Leukämie (AML) (1.2) aufgrund von Rekrutierung in fehlregulierten Korepressorkomplexen, worauf unter 1.4.1 genauer eingegangen wird.

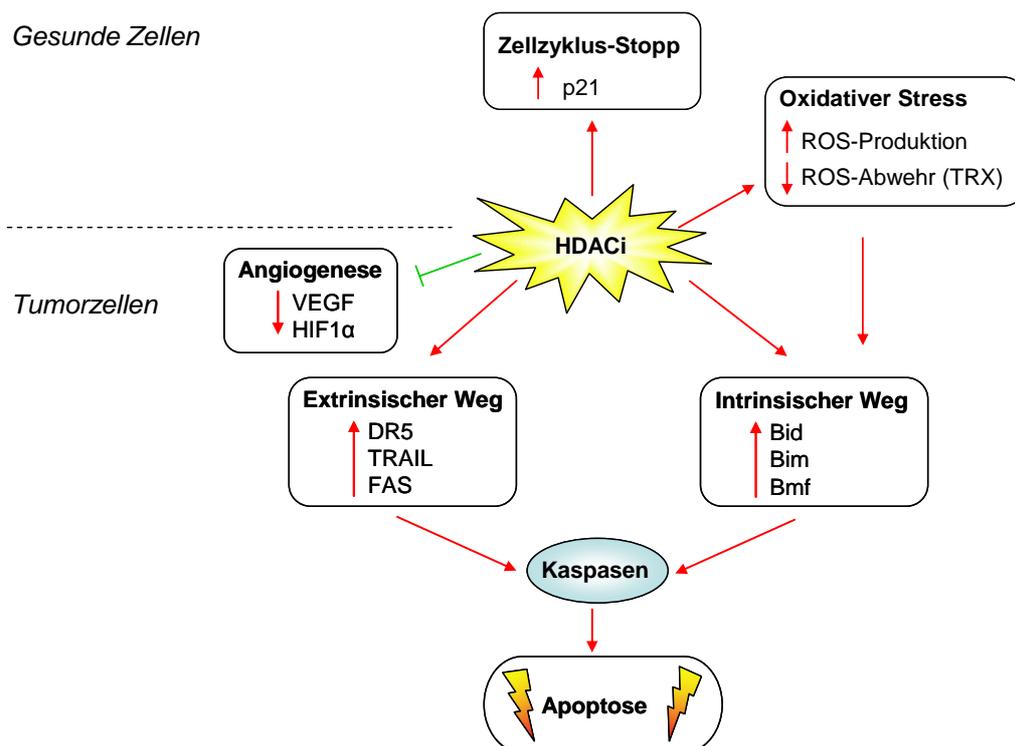
### **1.1.5 HDAC-Inhibitoren in der epigenetischen Krebstherapie**

HDAC-Inhibitoren (HDACi) stellen große Hoffnungsträger in der Tumorthherapie dar und können bei einem großen Spektrum von soliden bis hämatologischen Tumoren, den Zelltod induzieren. Während sie bei Krebszellen den Zelltod auslösen, bleiben gesunde Zellen bis auf auftretenden Zellzyklusarrest nahezu unbeschadet, wobei die Mechanismen in beiden Fällen noch nicht gänzlich geklärt sind und weiterer Forschung benötigen (Bolden, *et al* 2006, Marks and Xu 2009, Minucci and Pelicci 2006, Xu, *et al* 2007).

Als Basis für die HDACi-Resistenz bzw. geringere Sensitivität der gesunden Zellen wird spekuliert, dass Krebszellen aufgrund ihrer multiplen Defekte die kritischen Effekte von HDACi nicht mehr umkehren bzw. ausgleichen können (Marks and Xu 2009).

Aufgrund der geringeren Sensitivität der gesunden Zellen wird die HDAC Therapie im Allgemeinen in klinischen Studien sehr gut vertragen. Die Hauptnebeneffekte beinhalten Müdigkeit, Übelkeit, Dehydrierung, Durchfall und Thrombozytopenie (Thrombozytenmangel) (Marks and Xu 2009).

Zur Wirkungsweise der HDACi ist bekannt, dass sie den Wachstumsstopp und Zelltod über mehr als einen Mechanismus bzw. Signalweg hervorrufen ((Carew, *et al* 2008, Marks and Xu 2009) Abbildung 5)).



**Abbildung 5: Wirkungsweise von HDACi in gesunden und Tumorzellen.**  
Referenzen siehe Text. (verändert nach (Carew, *et al* 2008))

Zu diesen Wirkmechanismen gehören z.B. Induktion des Zellzyklus-Stopp (über Induktion von p21 in G1 Phase (Richon, *et al* 2000)), Steigerung des oxidativen Stresses, sowie extrinsischer (Todesrezeptor Signalweg) und intrinsischer (mitochondrialer) Apoptose und Inhibition der Tumorangiogenese (Carew, *et al* 2008, Marks and Xu 2009) (Abbildung 5).

Dabei wird die extrinsische Apoptose aktiviert durch Bindung der Liganden Fas und TRAIL (Tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand) an den Todesrezeptor, was über FADD Rekrutierung zur Aktivierung der Kaspase 8 führt, wobei HDACi eine Steigerung der Expression von TRAIL, TRAIL-R2 (DR5) Fas und TNF- $\alpha$  bewirken (Imai, *et al* 2003, Insinga, *et al* 2005, Nakata, *et al* 2004, Nebbioso, *et al* 2005, Singh, *et al* 2005, Sutheesophon, *et al* 2005).

Die intrinsische Apoptose wird durch Stress Stimuli wie Chemotherapeutische Agentien ausgelöst, die die Mitochondrienmembran zerstören und Cytochrom C und SMAC freisetzen, was zur Apoptosom Bildung und Aktivierung von Kaspase 9 führt. Kaspase 8 und 9 schneiden Kaspase 3, 6 und 7 was schließlich zur Apoptose führt. Diese Apoptosewege werden über pro-apoptotische (Bax, Bak, Bim, Bid, Bmf, etc.) und anti-apoptotische (Bcl-2, Bcl-X<sub>L</sub>, Mcl-1, etc) reguliert. HDACis verändern deren Gleichgewicht z.B. durch Inaktivierung von Bcl-2 und Bcl- X<sub>L</sub> (Rosato, *et al* 2003, Ruefli, *et al* 2001) und aktivieren Bmf und Bim (Carew, *et al* 2008, Ruefli, *et al* 2001, Zhang, *et al* 2006, Zhao, *et al* 2005).

Für alle HDACi wurde in zahlreichen Studien eine Aktivierung eines oder beider dieser Apoptosewege nachgewiesen (zusammengefasst in (Carew, *et al* 2008, Rosato, *et al* 2003)).

Des Weiteren können HDACi Apoptose auch direkt über p53 Stabilisierung (Aktivierung von pro-apoptotischen Genen wie Bax, Puma und Noxa) induzieren (Insinga, *et al* 2005, Ruefli, *et al* 2001, Xu 2003).

Außerdem stimulieren HDACi die Generierung von ROS (Rosato, *et al* 2003, Ruefli, *et al* 2001) und hemmen über Thioredoxin die ROS Abwehr (Butler, *et al* 2002, Ungerstedt, *et al* 2005), wodurch es über ROS Stress zur Aktivierung der intrinsischen Apoptose kommt (Sade and Sarin 2004), weshalb ROS Stress als wichtiger Mechanismus der HDACi Wirkung gilt.

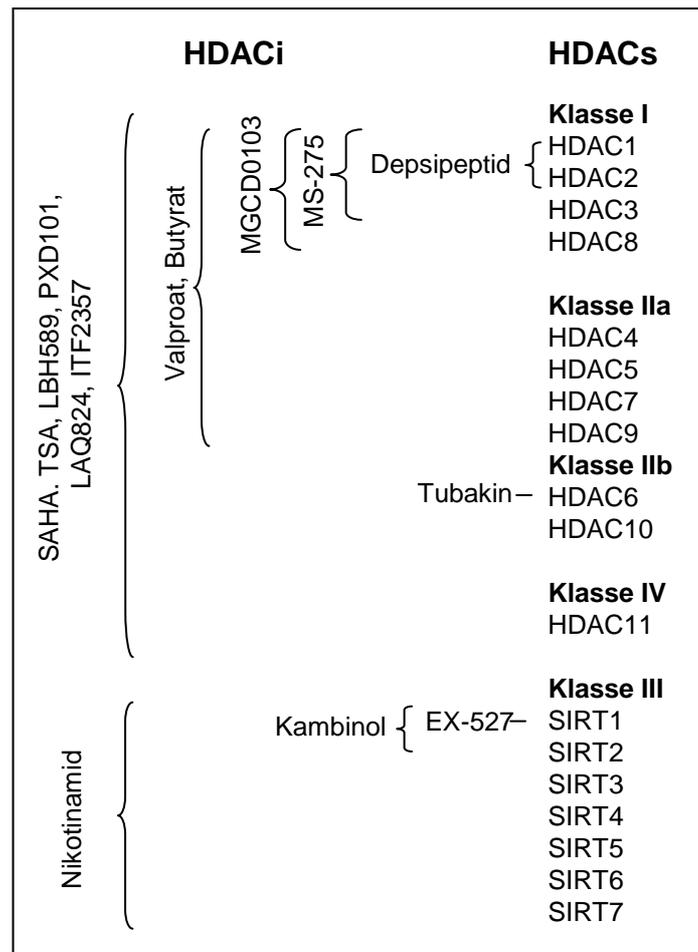
Ein weiterer Anti-Tumor Effekt von HDACis ist die Hemmung der Angiogenese, einem Schlüsselprozess in der Tumorentstehung und Metastasierung, durch Absenkung der Expression von pro angiogenese Faktoren wie VEGF (vascular endothelial growth factor) und HIF1 $\alpha$  (Hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$ ) (Deroanne, *et al* 2002, Qian, *et al* 2006b).

### **1.1.6 HDAC-Inhibitoren - Mechanismus der HDAC Inaktivierung**

Bei den HDACi unterscheidet man zwischen den HDACi, welche die Klasse der Zink-abhängigen HDACs (Klasse I, II, IV) hemmen und denen, die die NAD abhängigen Klasse III HDACs, die Sirtuine, hemmen (Abbildung 6).

Die Aktivität der Gruppe der Zink-abhängigen HDACs wird besonders inhibiert durch starke Zink Chelatoren, vor allem Thiole oder Derivate von Hydroxamsäure wie TSA (Trichostatin A) und SAHA (Suberoylanilidhydroxamsäure / Varinostat) (Richon, *et al* 1998, Richon, *et al* 1996), welche reversibel an das aktive Zentrum der HDACs binden.

Sirtuine werden entsprechend durch Blockierung ihrer NAD<sup>+</sup> Bindetasche gehemmt, wobei Nikotinamid (NAM) ein sehr potenter Inhibitor aller Sirtuine ist (Bitterman, *et al* 2002).



**Abbildung 6: Übersicht über Spezifität der HDAC-Inhibitoren.**

TSA = Trichostatin A, PXD101 = Belinostat, MS-275 = Entinostat, LBH589 = Panobinostat.

Während es für Sirtuine noch keine klinisch relevanten Inhibitoren gibt, sind für Klasse I, II und IV Inhibitoren besonders SAHA (Varinostat, Zulassung der US Gesundheitsbehörde), Depsipeptid (zyklisches Tetrapeptid) und MGCD0103 (Benzamid) zu nennen, die in vielen Studien im klinischen Einsatz sind (zusammengefasst in (Lane and Chabner 2009)).

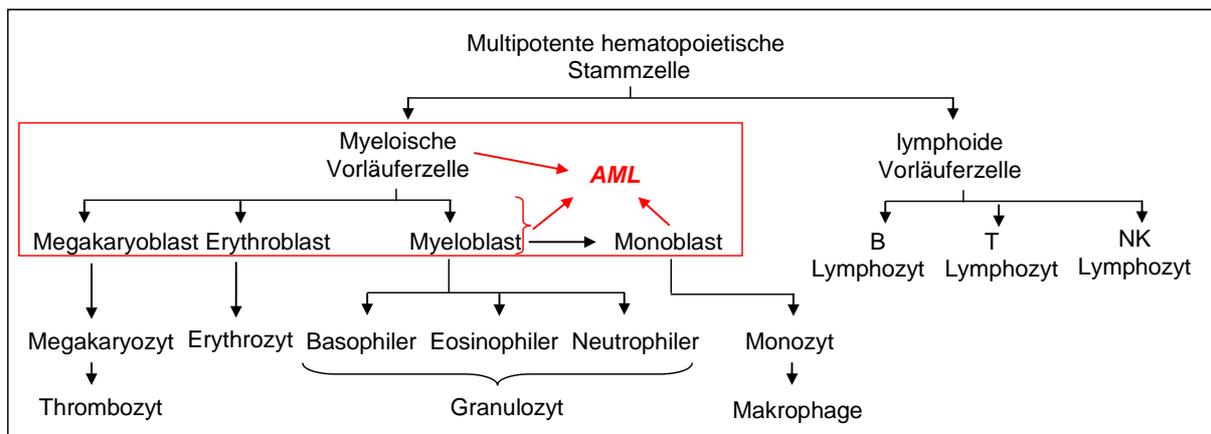
HDACi werden dabei selten als Monotherapie, sondern meist als Kombinationstherapie synergistisch mit Chemostatika (zusammengefasst in (Rasheed, *et al* 2008)) oder bei MDS und AML mit DNA-Methyltransferase Inhibitoren und ATRA (All-trans-retinoic acid, Differenzierung-induzierenden Substanzen) (Bishton, *et al* 2007, Kuendgen and Lubbert 2008) eingesetzt ((Carew, *et al* 2008, Galm, *et al* 2006, Lane and Chabner 2009, Marchion and Munster 2007, Nolan, *et al* 2008)).

Entsprechend der beschriebenen besonderen Rolle von HDACs in der Pathogenese von hämatologischen Neoplasien wie AML (1.1.4, 1.2) zeigen HDACi in klinischen Studien bei Leukämien besondere Erfolge, was genauer unter 1.4.1 beschrieben wird.

## 1.2 Akute Myeloische Leukämie (AML)

### 1.2.1 Definition, Inzidenz, Diagnose der AML

Die akute myeloische Leukämie (AML) ist eine sehr heterogene, aus mehreren Subtypen bestehende, maligne Erkrankung eines Teils des blutbildenden Systems, der Myelopoese, welche für die Bildung von Monozyten und Granulozyten sorgt (Abbildung 7). Sie ist charakterisiert durch starke, abnormale Vermehrung unreifer Vorstufen der myeloiden, erythroiden, megakaryozytischen und monozytischen Zelllinie. (Rubnitz, *et al* 2008)



**Abbildung 7: Normale Hämatopoese und Fehlfunktion bei AML.**

Sowohl die myeloischen Vorläuferzellen, Myeloblasten (Granulozytenvorläuferzellen), Monoblasten, Monozyten, erythroide und megakaryocytische Zellen können durch Fehlfunktionen, Translokationsprodukte und Onkoproteine zu AML transformiert werden (Cozzio, *et al* 2003, Jamieson, *et al* 2004, Rubnitz, *et al* 2008, So, *et al* 2003)

Wie alle akuten Leukämien basiert die AML auf genetischen Alterationen (1.2.3, 1.4.1) der hämatopoetischen Vorläuferzellen, gefolgt von klonaler Proliferation und Anhäufung von neoplastischen Zellen einhergehend mit der Verdrängung der physiologischen Blutbildung. Bei der Entstehung unterscheidet man zwischen De-novo-AML, welche ohne Vorzeichen bzw. Vorerkrankung auftritt und der therapieassoziierten (vorausgehende Krebstherapie), sekundären AML. Zu einem Drittel geht AML aus dem Myelodysplastischen Syndrom (MDS) hervor, einer heterogenen klonalen Knochenmarkserkrankung mit Unterproduktion normaler Blutzellen (verminderte Proliferation der Vorläuferzellen bei gestörter Differenzierung und Reifung) (Barzi and Sekeres, Delforge 2003).

Die AML ist die häufigste akute Leukämie mit einem Anteil von 80-90 % der akuten Leukämie Fälle beim Erwachsenen und ca. 15-20% bei Kindern (Ehninger, *et al* 2008b). Die Inzidenz der AML des Erwachsenen beträgt in Deutschland ca. 4,3/100000 für Männer und 2,9/100000 für Frauen und die Anzahl der Neuerkrankungen in Deutschland bei ca. 3600 pro

Jahr (Hellenbrecht, *et al* 2003). Das Durchschnittsalter bei Diagnosestellung beträgt 67 Jahre und die Inzidenz steigt mit dem Alter deutlich an (Horner, *et al* 2009).

Die AML ist trotz vieler diagnostischer und therapeutischer Fortschritten immer noch zum größten Teil unheilbar mit wenigen Langzeitüberlebenden über 60 Jahren.

Die Prognose bzw. die 5 Jahres Überlebensrate ist seit den 70ern mit 6 % aufgrund von verbesserten diagnostischen und therapeutischen Möglichkeiten auf aktuell 20 – 40 % angestiegen (Ries, *et al* 2006, Roumier and Cheok 2009), wobei das Alter die Überlebensrate entscheidend beeinflusst. So sinkt die 5 Jahres Überlebensrate von 45-50 % bei jüngeren Patienten (Gatta, *et al* 2005, Roumier and Cheok 2009, Smith, *et al* 2004) auf 26 % bei 45- bis 54-Jährigen und auf 2 % bei über 75-Jährigen ab (Ries, *et al* 2006). Die schlechtere Überlebensrate älterer Patienten beruht dabei auch auf der meist größeren Anzahl genetischer Aberrationen und der Tatsache, dass sie aufgrund der Behandlungsbedingten Nebenwirkungen bzw. Mortalität nicht so eine intensive Therapie wie jüngere Patienten erhalten können (Smith, *et al* 2004), was die Notwendigkeit neuer therapeutischer Strategien in AML, speziell eine Verringerung der Toxizität für die Mehrheit der älteren Patienten verdeutlicht.

Die Diagnose erfolgt durch Analyse des Knochenmarks bzw. peripherem Blut durch Nachweis der unreifen leukämischen Zellen sowie durch molekulargenetische Analysen zytogenetischer und molekularer charakteristischer Veränderungen (1.2.3), die maßgeblich die Prognose und das Therapieansprechen beeinflussen und ein wichtiges Kriterium zur Unterscheidung bzw. Einteilung der einzelnen AML-Subtypen (1.2.2) darstellen.

### 1.2.2 Systematische Einteilung der AML

Die systematische Einteilung der AML in die Subgruppen erfolgt durch zwei Klassifikationen. Die erste wurde Mitte der 70er Jahre als French-American-British-(FAB-) Klassifikation (Tabelle 3, AML M0-M7) eingeführt.

**Tabelle 3: FAB-Klassifikation der AML.** MPO = Myeloperoxidase (Preis, *et al* 2008)

AML-Subtyp	Morphologische Einteilung
<b>M0</b>	MPO zytochemisch negativ, immunologisch positiv, CD13 positiv
<b>M1</b>	unreife Myeloblasten-Leukämie
<b>M2</b>	Myeloblasten-Leukämie mit Ausreifung
<b>M3 / M3v</b>	Promyelozyten-Leukämie / mikrogranuläre M3, (beide t(15;17), t(11;17))
<b>M4 / M4E0</b>	akute myelomonozytäre Leukämie / AMMOL + > 5 % abnormale Eosinophile
<b>M5a / M5b</b>	unreife Monoblasten-Leukämie
<b>M6</b>	akute Erythroleukämie
<b>M7</b>	Megakaryoblasten-Leukämie

Diese basiert auf morphologischen und zytochemischen Merkmalen der Blastenpopulation und die Anteile reifer myeloischer Zellelemente (Bennett, *et al* 1976), sowie immunologischer und elektronenmikroskopischer Befunde (Bennett, *et al* 1985, Bennett, *et al* 1991).

Die systematische Analyse von zytogenetischen und molekularen Charakteristika von AML der letzten 15 Jahre zeigte, dass die genetischen Merkmale die Biologie der AML-Subtypen besser definieren, als nur die Morphologie und Enzymausstattung und führte zu der aktuellen WHO-Klassifikation (Tabelle 4) (Jaffe, *et al* 2001, Vardiman, *et al* 2009).

**Tabelle 4: WHO Klassifikation der AML.** (Preis, *et al* 2008)

---

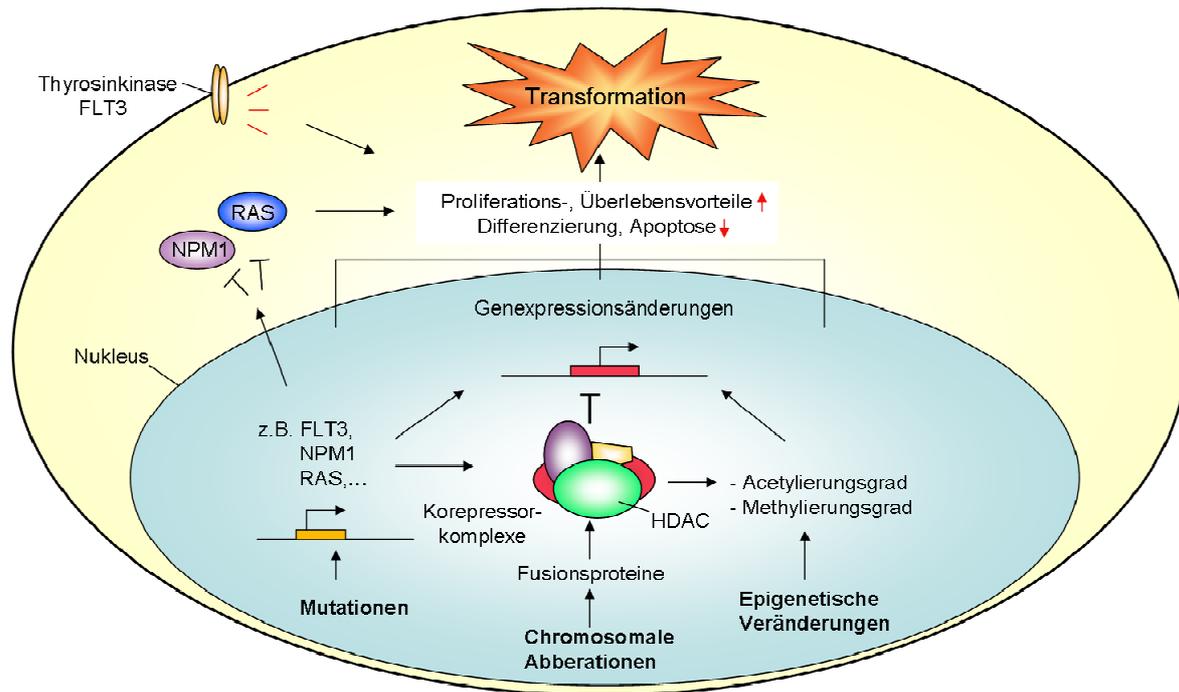
AML mit wiederkehrenden zytogenetischen Abnormalitäten
- mit t(8;21)(q22;q22), (AML1/ETO)
- mit inv(16)(p13;q22) oder t(16;16)(p13;q22), (CBFb/MYH11)
- akute Promyelozyten-Leukämie: mit t(15;17)(q22;q12), (PML/RAR $\alpha$ ) und Varianten
- mit 11q23 (MLL) Abnormalitäten
AML mit Dysplasie mehrerer Zellreihen (multilineär)
- mit MDS-Vorphase
- ohne MDS-Vorphase
AML und myelodysplastisches Syndrom, therapiebedingt
- nach alkylierenden Substanzen
- nach Topoisomerase-Inhibitoren
AML ohne weitere Kategorie
- mit minimaler Ausreifung, - ohne Ausreifung, - akute myelomonozytäre Leukämie,
- akute monoblastische und monozytäre Leukämie, - akute Erythroleukämie, - akute
Megakaryoblasten Leukämie, - akute Basophilen-Leukämie, - myeloisches Sarkom

---

### 1.2.3 Pathogenese und Prognostik – molekulare Ursachen der AML

Die molekularen Ursachen der malignen Transformation von myeloischen Zellen unterschiedlicher Stadien (siehe 1.2.1) stellen unterschiedliche genetische Aberrationen, chromosomale Translokationen und multiple Genmutationen dar, die mit der Zeit erworben werden und gemeinsam mit epigenetischen Veränderungen (s.f.) zu einem Proliferations- und Überlebensvorteil bei gestörter Differenzierung und Apoptose führen (Dash and Gilliland 2001, Galm, *et al* 2006, Gilliland 1998, Gilliland and Tallman 2002).

Ursache für die Entstehung von Leukämien sind meistens Gendefekte und Mutationen, die zentrale Regulatoren der Hämatopoese betreffen und für die beschriebenen Merkmale der AML, die gesteigerten Zellproliferation bei gleichzeitiger Differenzierungsblockade, sind Mutationen und Translokationen in mindestens zwei Signalwegen nötig (Abbildung 8).



**Abbildung 8: Modell der molekularen Mechanismen der AML Entstehung.**

Mutationen, Chromosomale Abberationen und epigenetische Veränderungen wirken zusammen und führen zur Transformation, zur Entstehung von AML. (Referenzen siehe Text, eigene Abbildung)

Dabei wurden für AML zum einen viele Mutationen in Genen aufgedeckt, die zu Proliferations- und Überlebensvorteilen führen, aber nicht die Differenzierung beeinflussen, wie z.B. FLT3, ALM, Ras und den BCR/ABL und TEL/PDGFR Fusionsgenen. Zum anderen wurden in AML Mutationen und Translokationen identifiziert, welche die Differenzierung und Apoptose betreffenden, zu denen z.B. Mutationen bei CEBPA, CBF, HOX Familienmitgliedern, CBP/P300 und Koaktivatoren von TIF1 und AML/ETO, PML/RAR $\alpha$  Fusionen gehören (Rubnitz, *et al* 2008).

Die Art und Zusammensetzung der beschriebenen Mutationen und Translokationen bzw. der Karyotyp und die Zytogenetik sind dabei die wichtigsten Prognosefaktoren (1.2.4).

Wie schon unter (1.1.4) bei den Zusammenhängen zwischen HDACs und Tumoren beschrieben, weiß man, dass neben diesen genetischen Ursachen auch epigenetische Veränderungen eine wichtige Rolle bei der Tumorphathogenese spielen und mit den genetischen Veränderungen zusammenwirken (Di Gennaro, *et al* 2004, Galm, *et al* 2006, Jones and Baylin 2007, Kelly, *et al* 2002)).

Bei AML kommen dabei nicht nur die beschriebenen allgemeinen Funktionen der HDACs (1.1.4) zum Tragen, sondern HDACs spielen bei der Pathogenese von AML eine besondere Rolle aufgrund ihrer Rekrutierung und Fehlregulierung in Korepressorkomplexen mit Fusi-

onsproteinen die durch die Translokationsprodukte entstehen, worauf unter (1.4) noch besonders eingegangen wird.

#### **1.2.4 Karyotyp/Zytogenetik – Prognosefaktoren bei AML**

Die bislang wichtigsten bzw. am besten analysierten (bekanntesten) prognostischen Marker stellen neben bestimmten Mutationen (s.u.) der Karyotyp bzw. die Zytogenetik (zytogenetischen Aberrationen) dar und können den Therapieerfolg entscheidend beeinflussen, wobei zwischen guter, mittlerer und schlechter Prognose bzw. Therapieansprechen unterschieden wird (wichtigsten Translokationen und Wirkung siehe Tabelle 6):

Eine gute Prognose, Therapieansprechen, Remissions- und Überlebensdauer haben z.B. AML Patienten mit den zytogenetischen Aberrationen t(8;21), t(15;17) und inv(16) und AML mit der Mutation NPM1 (Nukleophosmin), welche mit ca. 35 % die häufigste Mutation darstellt.

Patienten mit normalem Karyotyp haben eine mittlere Prognose und eine schlechte Prognose haben Patienten mit Deletionen in Chromosom 5 oder 7 oder Karyotypen mit mehr als drei zytogenetischen Aberrationen (komplexer Karyotyp). Weitere negative Faktoren sind Alter, eine sekundäre AML (Therapie-assoziierte AML) und Mutationen des FLT3 (Fms verbundene Tyrosin Kinase3) Gens, welches mit 30-35 % (Gilliland and Griffin 2002) neben NPM1 mit 35 % (Falini, *et al* 2005) die häufigste Mutation in AML darstellt.

Während die Gruppe mit guter Prognose eine Überlebensrate von durchschnittlich 7,6 Jahren hat und 30 % der Patienten darstellt, besitzt die Gruppe mit schlechter Prognose eine Überlebensrate von durchschnittlich 6 Monaten und stellt 30 % der Patienten dar. Den größten Anteil mit 50 % hat die Gruppe mit mittlerer Prognose und einer Überlebensrate von durchschnittlich 1,3 Jahren, wobei diese Gruppe die heterogenste Gruppe darstellt. (Byrd, *et al* 2002, Roumier and Cheok 2009) Entsprechend zeigen aktuell immer noch 15-30% der AML Patienten kein Therapieansprechen und 30-80% erkranken nach kurzer Heilung erneut (Rezidiv) (Lamba 2009).

AML Patienten mit schlechter Prognose und speziell die 50 % der AML Patienten mit mittlerer Prognose würden entsprechend neben neuen synergistisch eingesetzten epigenetischen Therapien mit HDAC-Inhibitoren (1.4.1) (zu dessen Optimierung unter anderem weitere Informationen über AML-Subtypspezifische Expressionen (3.1) nötig sind) auch sehr von der Identifikation weiterer neuer prognostischer Marker durch pharmakogenomische Analysen (1.3.1, 3.4) und entsprechenden Therapieoptimierungen der AML Standardtherapie mit Ara-C profitieren.

## 1.2.5 Therapie der AML

### 1.2.5.1 Standardtherapie Ara-C – Wirkung und Therapieeinsatz

Cytarabin bzw. Arabinosyl-Cytosin (Ara-C) ist seit über 40 Jahren das wichtigste und effektivste Element der Standardtherapie bei AML (Bernard, *et al* 1966, Perry 2008, Stam, *et al* 2003). Ara-C ist ein Deoxycytidine Analog und unterscheidet sich von dem natürlich vorkommenden Cytidin durch den Austausch von Arabinosid gegen Ribose, den Zuckerrest der Pyrimidin Base (Silagi 1965). Nukleoside und ihre Analoge sind hydrophile Moleküle und benötigen spezialisierte Membran Transporter, um in die Zellen zu gelangen (Abbildung 9) (Cass, *et al* 1998). Ara-C ist dabei von dem hENT1 (human equilibrative nucleoside transporter 1) abhängig (White, *et al* 1987, Wiley, *et al* 1982).

Die Wirkungsweise von Ara-C beruht auf der schnellen Umwandlung von inaktivem Ara-C in aktives Arabinosyl-Cytosin-Triphosphat (Ara-CTP), welches in Konkurrenz mit Cytidin in die DNA eingebaut wird und die DNA Synthese in der S-Phase des Zellzyklus blockiert (Abbildung 9) (Chuang and Chuang 1976, Furth and Cohen 1968, Perry 2008). Dadurch konzentriert sich die Wirkung auf sich schnell teilende Zellen (wie Krebszellen), die aktiv DNA synthetisieren (und die DNA Replikation für die Mitose benötigen) (Perry 2008). Ara-C hat sogar deutlich stärkere Effekte in sehr schnell proliferierenden Krebszellen (wie AML), als bei langsamer wachsenden soliden Tumoren (Perry 2008).

Aktives Ara-CTP inhibiert dabei sowohl die DNA-Synthese durch Inhibition der DNA-Polymerase (Furth and Cohen 1968) und (Fehl-)Einbau in die DNA (DNA Strang-Synthese-Abbruch), als auch durch Inhibition der RNA-Polymerase (Chuang and Chuang 1976).

Die Standard-Dosis einer Induktionstherapie beträgt 100-200 mg/m<sup>2</sup>/Tag (von Tag 1-7), wobei die intrazelluläre Ara-C Konzentration, welche von der Plasmakonzentration abhängt, 0,5 – 1 µM beträgt und bei Hochdosis Therapie (2 – 3 g/m<sup>2</sup>/Tag) auf über 10-50µM ansteigt (Capizzi, *et al* 1983, Galmarini, *et al* 2001, Perry 2008, Weinstein, *et al* 1982, Wiley, *et al* 1985) zusammengefasst in (Lamba 2009) (siehe auch Therapieschema in 2.6, Abbildung 11).

Ara-C wird neben der Leukämiebehandlung auch bei metastasierenden Tumoren (Lopez, *et al* 1985) und aufgrund der Fähigkeit die Blut-Hirn Schranke zu durchqueren auch in bei Lymphomen (Slevin, *et al* 1983) und anderen Krankheiten im zentralen Nervensystem eingesetzt (Kwong, *et al* 2009).

### 1.2.5.2 Ara-C Metabolismus

Bei einer Standardtherapie mit Ara-C (1.2.5.1) wird die Expression und Aktivität der Nucleosid-Transporter für den Import des Ara-C in die Zelle benötigt, wohingegen bei höheren Ara-C Dosen ( $2\text{-}3\text{g/m}^2$ ) und Plasmakonzentrationen von über  $50\mu\text{M}$  die Diffusionsrate von Ara-C den Transport über die Nucleosid-Transporter überwiegt (Capizzi, *et al* 1983).

Die zentralen Schlüsselenzyme des Ara-C Metabolismus (Abbildung 9) sind die Desoxycytidin Kinase (DCK), welche den ersten Schritt der Ara-C Phosphorylierung und Aktivierung katalysiert, sowie zwei Enzyme, die den Abbau von Ara-C regulieren, die Cytidin Deaminase (CDA) und die Deoxycytidylat Deaminase (DCTD). Die Aktivierung erfolgt über eine Phosphorylierungskaskade von Ara-C zum aktiven Ara-CTP, wobei die erste Phosphorylierung von Ara-C durch die DCK zu Ara-CMP den geschwindigkeitsbestimmenden Schritt darstellt (Chabner and Longo 1969). Diese wird von zwei weiteren Phosphorylierungen durch die Deoxycytidylat Kinase und Nucleosid Diphosphokinase zu Ara-CDP und schließlich zu der aktiven Form dem Ara-CTP gefolgt. Die Pyrimidin Nucleotidase I (PN-I, auch 5'Nucleotidase, NT5C2) wirkt der DCK entgegen und katalysiert die Dephosphorylierung von Ara-CMP (Amici, *et al* 1997).

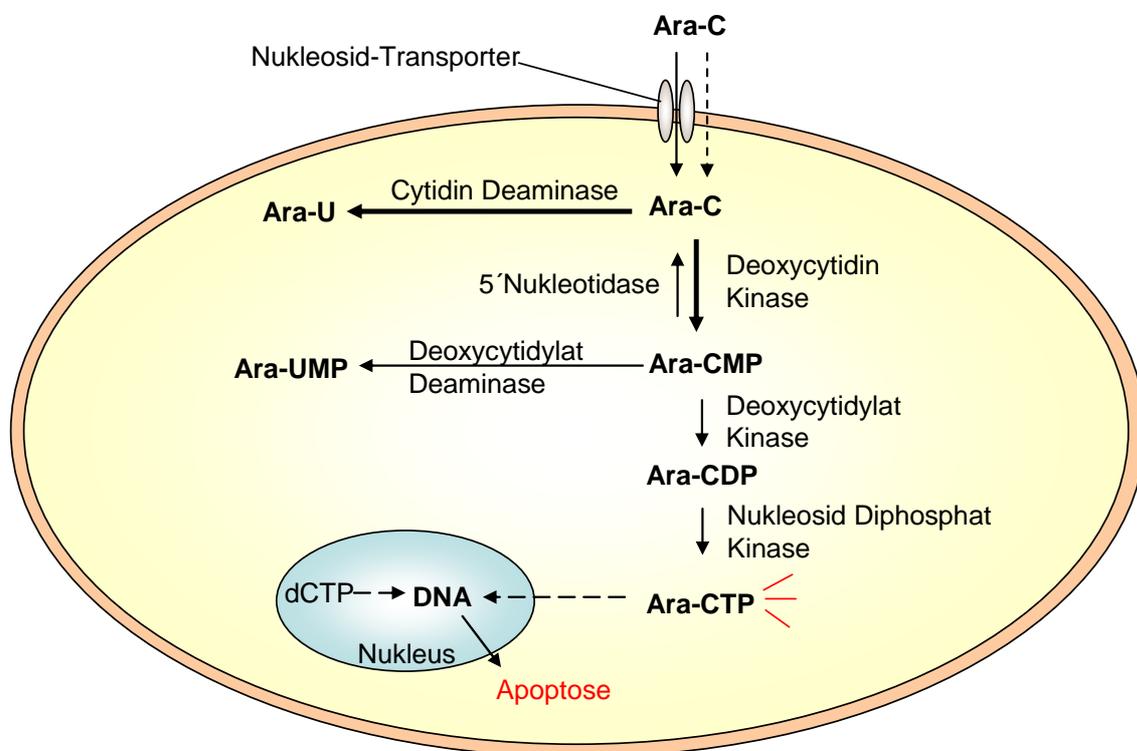


Abbildung 9: Ara-C Metabolismus mit beteiligten metabolischen Enzymen und Transporter. Nucleosid Transporter (hENT1, hCNT1).

Den aktivierenden Kinasen gegenüber steht die Inaktivierung von Ara-C, wobei die CDA dabei von besonderer Bedeutung ist, da sie direkt nach Import der inaktiven Form von Ara-C in die Zelle dessen irreversible Inaktivierung zu Arabinosyl-Uracil (Ara-U) katalysiert (Betts, *et al* 1994, Muller and Zahn 1979). Die DCTD katalysiert die Umwandlung von Ara-CMP zu Ara-UMP. (Stam, *et al* 2003)

Das aktive Ara-CTP wirkt durch Einbau in die DNA in Konkurrenz mit dCTP und führt zu Blockierung der DNA (und RNA) Synthese und Apoptose (Coleman, *et al* 1975, Kufe, *et al* 1980, Stam, *et al* 2003).

### 1.2.5.3 Ara-C Pharmakokinetik

Nach intravenöser Verabreichung wird es schnell in den Geweben verteilt (es passiert auch die Blut-Hirn-Schranke) und wird intrazellulär metabolisiert (aktiviert und deaktiviert) (1.2.5.2). Die Inaktivierung (Deaminierung) systemischen Ara-Cs durch die CDA erfolgt in der Leber, dem Plasma und Geweben. Ara-C wird hauptsächlich durch die Niere ausgeschieden, wobei 70-80 % der verabreichten Dosis innerhalb von 24 h über den Urin ausgeschieden wird (dabei 90 % als Metabolit und ca. 10% als unverändertes Ara-C) (Milano, *et al* 2002).

Die Angaben zur Plasma-Halbwertszeit schwankt in älteren Studien von weniger als 20 Minuten (Slevin, *et al* 1983) bis zu mehreren Stunden (2-6 h (Capizzi, *et al* 1983), Umsetzung von 63-73 % zu Ara-U innerhalb 24 h (DeAngelis, *et al* 1992), wobei aktuelle Studien 2-6 h (Patienten spezifisch) angegeben (Perry 2008).

### 1.2.5.4 Patientenspezifisches Ansprechen auf Ara-C Therapie

Beim Ansprechen auf die Ara-C Therapie treten immer wieder signifikante, individuelle, patientenspezifische Unterschiede bis hin zur Resistenzen auf, wobei das Therapieansprechen mit unterschiedlicher, besonders intrazellulären Akkumulation von Ara-CTP korreliert (Harris and Grahame-Smith 1982, Plunkett, *et al* 1985).

Es wurde dabei in verschieden *in vitro* und *in vivo* Studien gezeigt, dass neben den beteiligten Transportern (hENT1, hCNT1 (Hubeek, *et al* 2005, Stam, *et al* 2003) zusammengefasst in (Pastor-Anglada, *et al* 2004)) besonders die veränderte Expression und Aktivität der Schlüsselenzyme des Ara-C Metabolismus (1.2.5.2), wie die Desoxycytidin Kinase (DCK) (Colly, *et al* 1987, Kobayashi, *et al* 1994, Owens, *et al* 1992), die Cytidin Deaminase (CDA) (Colly, *et al* 1987, Neff and Blau 1996, Schroder, *et al* 1996) und die Deoxycytidylat Deaminase (DCTD) (Schroder, *et al* 1998) mit dem Ansprechen auf Ara-C Therapie korrelieren (zusammengefasst in (Cros, *et al* 2004, Galmarini, *et al* 2001, Lamba 2009)).

Als wichtigste genetische Ursache des patientenspezifischen Therapieansprechens werden Einzelnukleotid Polymorphismen / Single nucleotide polymorphisms (SNPs) (vgl. 1.3) in den Genen dieser Proteine angesehen, welche die Expressions- und Aktivitätsveränderungen hervorrufen (Lamba 2009), weshalb ihre Identifikation und Analyse in klinischen Studien eine große Hoffnung und zentrale Aufgabe im Hinblick auf eine bessere Prognose, angepasste Therapie und besseres Therapieansprechen darstellt (vgl. 1.3.1).

### **1.3 Single Nucleotide Polymorphisms und Pharmakogenetik**

Single Nucleotide Polymorphismen (SNPs) sind DNA-Mutationen in nur einem Nukleotid / einer Base, welche mit einer Häufigkeit von mindestens 1 % in der Bevölkerung auftreten (Barnes 2002) und stellen mit 90% die häufigste genetische Variation bei Menschen dar (Collins, *et al* 1998). Während die Zahl der identifizierten SNPs bei der ersten Sequenzierung des menschlichen Genoms bei 1,4 Millionen lag (dabei ca. 60000 in Exons) (Sachidanandam, *et al* 2001), ist sie mittlerweile auf über 4 Millionen bestätigte SNPs in der kaukasischen Bevölkerung (HapMap 2009, (Int.-HapMap-Consortium 2003)) angestiegen.

Im Durchschnitt kommen ca. 4 SNPs in der kodierenden Region eines Gens vor, die Hälfte davon sind nsSNPs (Cargill, *et al* 1999, Int.-HapMap-Consortium 2003, Wang, *et al* 1998a).

SNPs können, wenn sie in Promotorregionen liegen z.B. die Expression von Genen beeinflussen, indem sie zu Veränderungen von Transkriptionsfaktor-Bindestellen führen, oder die Funktion von Proteinen beeinflussen, wenn sie in Exonbereichen liegen und als nicht synonyme SNPs (nsSNPs) zu Veränderungen auf Aminosäureebene führen.

Entsprechend stellen speziell Promotor SNPs und kodierende nicht synonyme SNPs die zentralen „Untersuchungsobjekte“ der Pharmakogenomik dar, welche sich mit den Auswirkungen genetischer Variationen von Medikamenten-metabolisierenden Enzymen (Mahlknecht, *et al* 2009) und Transportern auf das Therapieansprechen beschäftigt, um die Ursachen patientenspezifischen Ansprechens bis hin zu Therapieresistenz aufzudecken. (Kalow, *et al* 1998)

Die Begriffe Pharmakogenetik und Pharmakogenomik werden zum Teil synonym verwendet, wobei sich die Pharmakogenetik mit der Analyse von einem oder ein paar ausgewählten Genen beschäftigt, während die Pharmakogenomik das gesamte Genom erfassen will.

#### **1.3.1 Pharmakogenetik in AML – SNPs im Ara-C Metabolismus**

Die deutlichsten Beispiele für das Therapieansprechen beeinflussende genetische Polymorphismen findet man bei Genen, die den Metabolismus von Medikamenten beeinflussen.

Mittels pharmakogenomischer Analysen genetischer Variationen von Medikament metabolisierenden Enzymen und Transportern und der durch ihre Interaktion hervorgerufenen Phänotypen bei der Therapie-Antwort, versucht man auch bei der AML, den Anteil der Patienten mit mittlerer bis schlechter Prognose zu verringern und neue diagnostische und therapeutische Optionen, patientenspezifische, gezielte Therapien durch die Aufdeckung neuer potentieller genetischer Marker zur Subklassifizierung von Patienten zu ermöglichen.

Bei AML mit Ara-C als dem wichtigsten Zytostatika der Therapie stellen entsprechend die Gene der Ara-C metabolisierenden Enzyme, DCK, CDA, DCTD, PN-I (1.2.5.2) und dem Nukleosid-Transporter hENT1 die zentralen Analyse-Kandidaten dar. Es ist auch schon durch zahlreiche Studien belegt, dass das patientenspezifische Ansprechen bis hin zur Ara-C Resistenz mit der Expressionstärke und Aktivität der Ara-C metabolisierenden Enzyme zusammenhängt und das SNPs, welche die Expression oder Aktivität dieser Enzyme beeinflussen, als Ursache für entsprechende Unterschiede verantwortlich sein können und es wurden schon eine Reihe von kodierenden und regulatorischen (Promotor-) SNPs dieser Kandidaten mit putativer funktioneller und klinischer Relevanz identifiziert (zusammengefasst in (Lamba 2009)), was in Tabelle 5 zusammenfassend dargestellt ist.

**Tabelle 5: Überblick potentieller Gene und SNPs für pharmakogenetische Studien zum Ara-C Metabolismus (und anderer Nukleosidanaloga – in Literatur).**

Referenzen zu hENT1 (Lamba 2009, Osato, *et al* 2003), DCK (Shi, *et al* 2004), gesunde Kaukasier (Joerger, *et al* 2006), CDA (Giovannetti, *et al* 2008, Kirch, *et al* 1998, Sugiyama, *et al* 2007, Ueno, *et al* 2009, Yue, *et al* 2003), DCTD (Gilbert, *et al* 2006), PN-I / NT5C2 (in (Lamba 2009) (Int.-HapMap-Consortium 2003)).

Gen	Gen-symbol	SNP	Patientendaten -> Therapie
<b>Nukleosid Transporter</b> (human equilibrative nucleoside transporter)	hENT1 (SLC29A1)	C-1345G, G-1050A, G-706C, Asp59Glu Ala430Thr	keine
<b>Deoxycytidin Kinase</b>	DCK	C-360G, C-201T P122S K242Q	Chinesische AML Patienten -> Ara-C gesunde Kaukasischer
<b>Cytidin Deaminase</b>	CDA	A-92G, C-451T, C-897A Lys27Gln Ala70Thr	Lungenkrebs, Bauch- Speicheldrüsenkrebs, Japan -> Gemcitabine AML -> Ara-C
<b>Deoxycytidylat Deaminase</b>	DCTD	Asp58Asn	keine
<b>5´Nukleotidase</b>	PN-I / NT5C2	Ala3Thr Arg136Gln	keine

Es ist hervorzuheben, dass die dargestellte bisherige Identifizierung von SNPs mit Relevanz im Ara-C Metabolismus einen ersten Schritt in Richtung Aufklärung der patientenspezifi-

schen Unterschiede und Therapie-Optimierung darstellt, sich jedoch noch am Anfang befindet, da viele der bisher aufgedeckten SNPs mit Relevanz im Ara-C Metabolismus zum einen noch auf ihr Vorkommen in der kaukasischen Bevölkerung und zum anderen auf ihre klinische Relevanz, d.h. ihren Einfluss auf Ansprechen auf Ara-C Therapie in klinischen Studien analysiert werden müssen. Des Weiteren gibt es viele weitere SNP Kandidaten in Datenbanken, die noch nicht funktionell analysiert wurden (3.4.1).

Erst nach vollständiger Aufdeckung und Analyse aller Kandidaten kann eine Abschätzung der Wechselwirkungen der Effekte der relevanten SNPs bei gemeinsamem Auftreten, also der Gesamtauswirkungen erfolgen und in eine Therapieanpassung umgesetzt werden (4.4.6).

Dabei besteht der erste und wichtigste Schritt in der Aufdeckung und Analyse aller relevanten SNPs in den wichtigsten Schlüsselenzymen des Ara-C Metabolismus (3.4, 4.4).

#### **1.4 Epigenetik in der Pathogenese und Therapie von AML**

Im Gegensatz zu der eher unspezifischen („eines für alles“) Standardtherapie mit Ara-C fokussiert sich die aktuelle Forschung in der AML Therapie auf spezifische, zielgerichtete Therapien, die sich zum einen gegen genomische Aberrationen, Fusionsproteine oder Fehlregulierte zelluläre Stoffwechselwege richten, die für spezielle AML Subgruppen charakteristisch sind (Blum and Marcucci 2005) und zum anderen in Form von epigenetischen Therapien gegen die fehlregulierten HDACs richten (Dransfeld, *et al* 2007), mit dem Ziel eine individualisierte, subtypspezifische Therapie mit erhöhter Effizienz bei gleichzeitig geringeren Nebenwirkungen zu erreichen.

Aufgrund der dargestellten zentralen Rolle von HDACs in der Tumorphagenese (1.1.4) als auch aufgrund der besonderen Rolle von HDACs in der Pathogenese von AML durch die Rekrutierung in fehlgeleiteten onkogenen Fusionsproteinen (1.4.1), stellen HDACs bei AML eine besondere Basis für innovative epigenetische Therapiestrategien dar, was auch dazu führt, dass die klinischen Studien mit HDAC Inhibitoren (HDACi) bei AML (und myelodysplastischen Syndromen (MDS)) besonders viel versprechende Erfolge zeigen (Bishton, *et al* 2007, Carew, *et al* 2008, Galm, *et al* 2006, Kuendgen and Lubbert 2008, Lane and Chabner 2009). Auch bei AML zeigten sich dabei die besten Erfolge durch synergistischen Einsatz bzw. Wirkung von DNA-Methylierungs- und HDAC-Inhibitoren (zusammengefasst in (Bishton, *et al* 2007, Galm, *et al* 2006, Mercurio, *et al* 2010)).

### 1.4.1 HDACs in der Pathogenese von AML

Es ist schon lange bekannt, dass eine Fehlregulierung der transkriptionellen Kontrolle ein Schlüsselement bei der Pathogenese von hämatologischen Krankheiten ist (Mahlknecht and Hoelzer 2000). HDACs, speziell Klasse I HDACs, spielen in diesem Zusammenhang eine zentrale Rolle durch Ihre Beteiligung in fehlregulierten Ko-Repressor-komplexen (Tabelle 6), sowie im Falle von HDAC3 (5q31) (Mahlknecht, *et al* 1999) und HDAC9 (7p21) ((Mahlknecht, *et al* 2002), Klasse II HDAC) aufgrund der Lage ihrer Genloki in chromosomalen Regionen, die besonders anfällig sind für Chromosomenbrüche (Le Beau, *et al* 1986, Le Beau, *et al* 1993, Rowley, *et al* 1981). Solche chromosomalen Anomalien können die Verfügbarkeit funktionell aktiver HDACs beeinflussen und zu einer Fehlfunktion des streng kontrollierten Gleichgewichts der Histon-Acetylierung führen (Mahlknecht and Hoelzer 2000).

Wie unter (1.2.4) beschrieben, wurden nicht nur schon viele charakteristische chromosomale Anomalien, Translokationen und Fusionsproteine identifiziert und mit AML-Subtypen, als auch mit Prognose und Therapieansprechen korreliert, sondern es wurden auch schon an den unterschiedlichen Korepressor-komplexen beteiligte HDACs aufgedeckt (Tabelle 6).

**Tabelle 6: Beispiel häufiger Chromosomenaberrationen bei AML mit rekrutierten HDACs.**

(Dastugue, *et al* 1995, Grimwade, *et al* 1998, Haferlach, *et al* 2004), zusammengefasst in (Ehninger, *et al* 2008a) und I= (Amann, *et al* 2001), II = (Cameron, *et al* 1999), III = (Durst, *et al* 2003), IV = (Grignani, *et al* 2000). Prognose siehe (1.2.4) und sehr gut für t(15;17)(q22;12).

Chromosomen-aberration	Fusionsgen	Korepressor-komplex	HDAC Beteiligung	FAB-Subtyp	Inzidenz [%]
t(8;21)(q22;q22)	AML1-ETO	N-CoR/SMRT	HDAC1, 2, 3 [I, II]	M2/(M1)	8-12
Inv(16)(p13q22)	CBFβ-MYH11	Sin3A	HDAC8 [III]	M4E0	8-12
t(15;17)(q22;12)	PML-RARα	N-CoR	HDAC1, 2, 3 [IV]	M3	5-10

Bei der akuten promyelozyten Leukämie (APL, M3, 5-10 % der AML (Lowenberg, *et al* 1999)), binden und reprimieren die APL spezifischen Retinolsäure (Vitamin A)-Rezeptoren α (RARα) Fusionsproteine PML/RARα und PLZF/RARα konstitutiv die Promotoren von RARα Zielgenen durch aberrante Rekrutierung von Multiprotein-Komplexen an denen auch HDAC3 beteiligt ist (Atsumi, *et al* 2006). Die APL stellt aufgrund einer außergewöhnlich hohen Heilungsrate von 80% einen Sonderfall dar, der auf gezielter Therapie mit dem Vitamin A Analog All-trans-Retinolsäure (ATRA) beruht (zusammengefasst in (Ehninger, *et al* 2008a)).

Weitere wichtige und häufige Beispiele für durch Fusionsproteine fehlregulierte Korepressor-komplexe gehören die "Core binding factor" assoziierten AMLs (CBF-AMLs) t(8;21)

(q22;q22) (AML1/ETO), inv(16)(p13q22) (CBF $\beta$ /MYH11) und t(15;17)(q22;q21) (PML/RAR $\alpha$ ), welche ca. ein Drittel aller chromosomalen Aberrationen in AML ausmachen (Langabeer, *et al* 1998) und HDACs 1, 2, 3 und 8 rekrutieren.

Bei t(8;21)(q22;q22), der zweithäufigsten genetischen Alteration bei AML interferiert das Fusionsprotein AML1/ETO mit der normalen Interaktion der Transkriptionsfaktoren AML1 und ETO mit ihren Ziel promotoren (Wang, *et al* 1998b). HDAC1, 2 und 3 werden dabei von ETO rekrutiert, welches als Plattform für die Rekrutierung von HDACs und Korepressoren dient und das Fusionsprotein stört die physiologische Funktion von AML1 und ETO (Amann, *et al* 2001).

Bei AML inv(16), welche in ca. 8% der AML vorkommt (Mitelman and Heim 1992), wurde für das CBF $\beta$ /MYH11 Fusionsprotein eine Interaktion mit mSin3A und HDAC8 nachgewiesen (Durst, *et al* 2003).

Die beschriebene Rekrutierung von HDACs in diesen fehlregulierten Korepressor komplexen stellt entsprechend ein schwerwiegendes Ereignis in der Pathogenese von AML (und MDS) dar und somit die Basis für innovative epigenetische Behandlungsstrategien, wie die HDAC-Inhibitortherapie (1.1.6, 1.4, 1.4.2) (Mahlknecht and Hoelzer 2000, Mei, *et al* 2004).

#### **1.4.2 HDAC-Inhibitoren in der Therapie von AML**

Die beschriebenen zentralen zellulären Funktionen von HDACs (1.1.3.3), deren Rolle in der Tumorphathogenese im Allgemeinen (1.1.4) und die spezielle Rolle von HDACs in der Pathogenese von AML (1.4.1) heben die Bedeutung veränderter HDAC Aktivität und Expressionsmuster und die Möglichkeit gezielter therapeutischer Intervention hervor.

Nachdem gezeigt wurde, dass die Behandlung von AML Zellen mit HDACi die Zellen für Differenzierungs- und Apoptose-Signale resensibilisieren (Bruserud, *et al* 2006, Melnick and Licht 2002), sind HDACi als Monotherapie, als auch in Kombination mit anderen Medikamenten (1.4) in Studien der Phase I und II (Kuendgen, *et al* 2006, Lübbert and Claus 2007b, Minucci and Pelicci 2006, Tsapis, *et al* 2007), sowie im Fall von SAHA, auch in klinischen Studien der Phase III im Einsatz (Lübbert and Claus 2007a, Mercurio, *et al* 2010). Dabei zeigte die HDACi Therapie bei AML viel versprechende klinische Ergebnisse (1.4, (Mercurio, *et al* 2010)), wobei auch bei der HDACi Therapie patientenspezifische und dosisabhängige Unterschiede (im Therapieansprechen) auftreten (Stapnes, *et al* 2007).

Hauptursachen für die dosisabhängigen, patientenspezifischen Unterschiede sind unter anderem Unterschiede in der Expression von HDACs in Untergruppen von Patienten (Bruserud, *et*

*al* 2007), wobei HDAC Expressionslevel auch schon als Biomarker für Therapieansprechen diskutiert werden (Schrump 2009, Stimson and La Thangue 2009).

Während bisher nur Daten zu HDAC Expressionsveränderungen in AML aus einer sehr kleinen Studie (23 Patienten) und ohne Berücksichtigung der AML Subgruppen vorliegen (Bradbury, *et al* 2005), wird im Zusammenhang mit dem Einsatz von HDAC Inhibitoren als neue Therapiestrategie und den patientenspezifischen Effekten, die Identifikation und Nutzung von AML-Subtypspezifischen HDAC Expressionsmustern als möglicher zusätzlicher neuer diagnostischer und prognostischer Ansatz bzw. Biomarker und mögliche Basis für Dosisanpassungen und Therapieoptimierungen deutlich (Bradbury, *et al* 2005, Ehninger, *et al* 2008a, Weichert 2009).

## 1.5 Aufgabenstellung / Ziel

AML ist eine sehr heterogene Krankheit mit charakteristischen Subtypen und einer Standardtherapie mit Ara-C mit immer wieder auftretenden patientenspezifischen Therapieansprechen bis Resistenzen und schlechten Überlebensraten. Neben der Individualisierung und Optimierung der Ara-C Therapie werden besonders in neue, innovative epigenetische Therapieansätze mit HDAC-Inhibitoren aufgrund der zentralen Rolle von HDACs in der AML Pathogenese große Hoffnungen gesetzt.

In der vorliegenden Arbeit sollten Analysen zu Pathogenese und Therapie von AML speziell unter epigenetischen, sowie pharmakogenetischen Zusammenhängen durchgeführt werden. Dabei sollten der epigenetische Fokus auf Histon-Deacetylasen in der Pathogenese und Therapie der AML und der pharmakogenetische Fokus auf dem Einfluss von SNPs in Ara-C metabolisierenden Enzymen liegen.

Im Zusammenhang der Optimierung des Einsatzes von HDAC Inhibitoren, welche bisher ohne Unterscheidung zwischen den AML-Subtypen eingesetzt werden, sollten mittels Genexpressionsanalysen putative charakteristische AML-Subtypspezifische Unterschiede im Expressionsmuster von HDACs identifiziert werden, welche Einfluss auf die Wirkung und Anwendung (Dosierung) von HDAC-Inhibitoren haben könnten.

Mit Bezug auf die Rolle von Klasse I HDACs in der Pathogenese von AML sollte eine putative Funktion von nicht synonymen SNPs (nsSNPs) in Klasse I HDACs bei der Anfälligkeit für AML mit Hilfe von allelspezifischer TaqMan PCR analysiert werden.

Falls möglich sollte zusätzlich anhand eines interessanten Kandidaten beispielhaft die Funktionalität validierter nsSNPs untersucht werden.

Im Kontext der Optimierung und Individualisierung der Ara-C Standardtherapie sollten via *in silico* Analysen von SNP Datenbanken und Literaturrecherche Promotor-SNPs und nsSNPs in den drei Schlüsselenzymen des Ara-C Metabolismus identifiziert, validiert und auf putative Korrelationen mit Therapieansprechen und Prognose (Überleben) analysiert werden.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Labormaterialien

Alle neben den herkömmlichen im Labor verwendeten Geräte, sowie alle Lösungen und Reagenzien sind im Folgenden an den entsprechenden Stellen vermerkt, soweit sie nicht von den Firmen Merck, Darmstadt oder Sigma Aldrich, Deisenhofen bezogen wurden.

### 2.2 Nukleinsäuren

#### 2.2.1 Plasmide

##### 2.2.1.1 erworbene Plasmide

Die im Rahmen dieser Arbeit verwendeten und käuflich erworbenen oder von entsprechend vermerkten Personen zur Verfügung gestellten eukaryotische Expressionsvektoren mit unterschiedlichen Resistenzen (pCMVtag4a besitzt eine Neomycin und Kanamycin Resistenz, pEGFP-C1 eine Kanamycin und pcDNA3.1 eine Ampicillin Resistenz.) sind in Tabelle 7 aufgeführt.

**Tabelle 7: Übersicht der erworbenen oder zur Verfügung gestellten Plasmide.**  
Referenz zu pcDNA3.1-hSIRT3-Flag [I, II = (North, *et al* 2005, Schwer, *et al* 2002)]

Nr.) Bezeichnung	Merkmal	Hersteller / Quelle
1) pCMVtag4a	c-terminales FLAG-tag	Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA
2) pCMVtag4a-SIRT1-WT / hSIRT1 <sub>WT</sub>	SIRT1 WT ohne Stopp mit C-terminalem FLAG-tag	Barbara Zschörnig, Jose Carreras Zentrum - Uniklinik Homburg
3) pEGFP-C1	N-terminaler GFP-tag	Clontech Laboratories, Saint-Germain-en-Laye, Fr
4) pcDNA3.1-hSIRT3 <sub>WT</sub> -Flag / hSIRT3 <sub>WT</sub>	SIRT3 WT cDNA ohne Stoppkodon mit C-terminalem FLAG-tag	E. Verdin, Gladstone Institute, San Francisco, CA

##### 2.2.1.2 Selbst hergestellte, veränderte Plasmide

Mittels zielgerichteter Mutagenese-PCR (vgl. 2.7.9.1) wurden mit Hilfe dieser erworbenen Plasmide, die in Tabelle 8 dargestellten Plasmide hergestellt.

**Tabelle 8: Übersicht der in der Arbeit hergestellten Plasmide.**

Nr.)	Bezeichnung	Herstellung	Merkmal
5)	pcDNA3.1-hSIRT3 <sub>H248Y</sub> -Flag	Mutagenese PCR von (4) mit UM621 und 622	SIRT3 inaktive Mutante mit C-terminalem FLAG-tag
6)	pcDNA3.1-hSIRT3 <sub>R80W</sub> -Flag	Mutagenese PCR von (4) mit UM567-a und -b	SIRT3 SNPR80W Mutante mit C-terminalem FLAG-tag
7)	pcDNA3.1-hSIRT3 <sub>V208I</sub> -Flag	Mutagenese PCR von (4) mit UM569-a und -b	SIRT3 SNPV280I Mutante mit C-terminalem FLAG-tag
8)	pEGFP-hSIRT3 <sub>WT</sub>	EcoRI/EcoRI-Fragment aus (4) über EcoRI/EcoRI in (3)	SIRT3 WT mit N-terminalem GFP-tag
9)	pEGFP-hSIRT3 <sub>H248Y</sub>	EcoRI/EcoRI-Fragment aus (5) über EcoRI/EcoRI in (3)	SIRT3 inaktive Mutante mit N-terminalem GFP-tag
10)	pEGFP-hSIRT3 <sub>R80W</sub>	EcoRI/EcoRI-Fragment aus (6) über EcoRI/EcoRI in (3)	SIRT3 SNPR80W Mutante mit N-terminalem GFP-tag
11)	pEGFP-hSIRT3 <sub>V208I</sub>	EcoRI/EcoRI-Fragment aus (7) über EcoRI/EcoRI in (3)	SIRT3 SNPV280I Mutante mit N-terminalem GFP-tag

Alle hergestellten Vektorkonstrukte wurden mittels direkter DNA Sequenzierung durch die Firma MWG Biotech (Martinsried) sequenziert (2.7.7).

## 2.2.2 Oligonukleotide

Die verwendeten Oligonukleotide wurden von der Firma Thermo Electron (Ulm) in lyophilisierter, entsalzter Form bezogen, mit ddH<sub>2</sub>O- auf eine Konzentration von 100 µM eingestellt und bei -20 °C gelagert. In den Oligonukleotiden eingefügte mutierte Basen (für Mutagenese PCR 2.7.9.1) sind fett hervorgehoben.

**Tabelle 9.: Übersicht der verwendeten Oligonukleotide.**

Die UM-Nr. bezieht sich auf die in der Arbeitsgruppe verwendete durchgehende Nummerierung aller Oligonukleotide. f = forward / vorwärts Primer, r = reverse / rückwärts Primer

Nr.	Verwendungszweck	Sequenz [5´-3´]
UM621	SIRT3 Mutagenese H248Y	f: CTGGTTGAAGCTTATGGAACCTTTGC
UM622	SIRT3 Mutagenese H248Y	r: GCAAAGGTTCCATAAGCTTCAACCAG
UM569-a	SIRT3 Mutagenese V208I	f: ACTACAAGCCCAACATCACTCACTACTTTCTCCGGC
UM569-b	SIRT3 Mutagenese V208I	r: GCCGGAGAAAGTAGTGAGTGATGTTGGGCTTGAGT
UM567-a	SIRT3 Mutagenese R80W	f: TGCCCAGGGCATTCTGGAGGCAGCCGAGGGC
UM567-b	SIRT3 Mutagenese R80W	r: GCCCTCGGCTGCCCTCCAGAATGCCCTGGGCA

## 2.3 Bakterien

### 2.3.1 Bakterienstämme

Die in dieser Arbeit durchgeführten Klonierungen erfolgten mit dem *E. coli* K12-Stamm DH5 $\alpha$ , welcher ursprünglich von der Deutschen Sammlung für Mikroorganismen in Göttingen bezogen wurde.

Für die gerichtete Mutagenese (2.7.9.1) wurde der *E. coli* Stamm XL1-Blue (Stratagene, Cedar Creek, mit Tetrazyklinresistenz) verwendet.

### 2.3.2 Aufbewahrung und Kultivierung

Zur langfristigen Konservierung transformierter *E. coli* Stämme wurden 700  $\mu$ l einer in autoklaviertem *Luria Bertani* (LB)-Flüssigmedium (20 g LB Broth base (Gibco BRL, Paisley; enthält: 0,5 % Hefeextrakt, 1 % Trypton und 1 % NaCl) ad 1000 ml dd H<sub>2</sub>O) angezogenen ü.N.-Kultur mit 300  $\mu$ l sterilem Glycin versetzt, in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

Die Selektion positiver Transformanten erfolgte entsprechend dem verwendeten Plasmid (2.2.1) und dem verwendeten Bakterienstamm durch Zusatz von 100  $\mu$ g/ml Ampicillin (Stocklösung 100mg/ml; 1 g Ampicillin (AppliChem, Darmstadt) ad 10 ml dd H<sub>2</sub>O, Lagerung bei -20 °C) bzw. 30  $\mu$ g/ml Kanamycin (Stocklösung 30mg/ml; 0,3 g Kanamycin (PAN Biotech GmbH, Aidenbach) ad 10 ml dd H<sub>2</sub>O, Lagerung bei 4 °C). ü.N.-Kulturen für die Präparation von Plasmid-DNA wurden aus Einzelkolonien von Agar-Platten (LB-Medium mit 1,5 % Agar (Gibco BRL, Paisley). Die Zugabe des entsprechenden Antibiotikums erfolgte nach dem Abkühlen auf <50 °C.) angeimpft und für 14-16 h bei 37 °C und 200 U/min inkubiert. Zur Anzucht von Plattenkulturen wurden Bakterien aus einer Glycerinkultur oder aus einem Transformationsansatz auf LB-Agarplatten ausgestrichen und ü.N. bei 37 °C im Brutschrank inkubiert.

### 2.3.3 Herstellung kompetenter *E. coli*

Kompetente Bakterien wurden mittels CaCl<sub>2</sub>-Methode hergestellt (Mandel and Higa 1970). Eine ü.N.-Kultur des entsprechenden Bakterienstammes wurde 1:100 in 200 ml LB-Medium angeimpft und bei 37 °C bis zu einer OD<sub>600</sub> von 0,4 - 0,6 bei 200 U/min inkubiert. Nach Zentrifugation der Kultur für 10 min bei RT und 3000 g wurde das Pellet in 100 ml eiskaltem 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Puffer vorsichtig resuspendiert, 20 min auf Eis inkubiert und erneut für 10 min

bei 4°C und 3000 g zentrifugiert. Danach wurde das Pellet in 2 ml eiskaltem 0,1 M CaCl<sub>2</sub>-Puffer resuspendiert, in 200 µl Aliquots mit Glycerin (20% Endkonzentration) versetzt und sofort in flüssigem Stickstoff schockgefroren und bei -80 °C gelagert.

### **2.3.4 Transformation von *E. coli* mit Plasmid-DNA**

Zur Hitzeschock-Transformation wurden kompetente *E. coli* auf Eis aufgetaut, mit 50 - 500 ng Plasmid-DNA versetzt und nach 30 min Inkubation auf Eis, in der die DNA an die Zellen adsorbiert, für 45 sek. auf 42 °C erwärmt (Hitzeschock) und anschließend 2 min auf Eis inkubiert. Nach Zugabe von 500 µl LB-Medium (2.3.2) wurde 1 h bei 37 °C und 200 U/min inkubiert, um die Antibiotikaresistenz des transformierten Plasmids zu exprimieren. Für die Durchführung gerichteter Mutagenesen (2.7.9.1) erfolgte dieser Schritt in SOC-Medium (2% Trypton, 0,5% Hefeextrakt, 10 mM NaCl, 2,5 mM KCl, 10 mM MgCl<sub>2</sub>, 10 mM MgSO<sub>4</sub>, 20 mM Glukose). 20 - 100 µl des Transformationsansatzes wurden dann auf entsprechenden Selektionsplatten ausplattiert und ü.N. bei 37 °C im Brutschrank inkubiert. Zur Kontrolle der Transformation wurde bei Transformationen nach Ligationen ein Ansatz mit linearisiertem Vektor mitgeführt, um eine Aussage über dessen Religationsfähigkeit und entsprechende Wahrscheinlichkeit der Fragmentinsertion treffen zu können.

## **2.4 Eukaryotische Zelllinien**

### **2.4.1 Kultivierung eukaryotischer Zelllinien**

Die verwendeten Zelllinien HEK 293T (humane embryonale Nierenzellen, (Graham, *et al* 1977), DSMZ, Braunschweig), HeLa (humane epitheliale Zervixkarzinomzellen, (Scherer, *et al* 1953), DSMZ, Braunschweig) und H-JR-Mito-HeLa Zellen (exprimieren mitochondriales fluoreszenzmarkiertes Protein „JRed-Mitochondrien“, Marinpharm, Luckenwalde), wurden in „Dulbecco’s modified eagle medium“ (DMEM) Zellkulturmedium (PAA, Pasching, Österreich), mit 10 % fötalem Rinderserum (FBS, PAA, Pasching) und 1 % Penicillin/Streptomycin (Gibco Invitrogen, Carlsbad, CA) (sowie im Falle der H-JR-Mito-HeLa Zellen mit 1 % nicht-essentieller Aminosäuren (Biochrom AG, Berlin) in einem Brutschrank bei 37 °C mit 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit in 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflaschen (Greiner Bio-One, Essen) inkubiert. Die Passagierung konfluenter Zellen erfolgte durch Waschen mit PBS (phosphate-buffered saline, Cambrex, Verviers, Belgien), Inkubation mit 2 ml Trypsin/EDTA Lösung (0,05% Trypsin/0,02% EDTA (Gibco, Karlsruhe)), gefolgt von Inaktivierung des

Trypsins durch FBS durch Medienzugabe und entsprechender Verdünnung. Mediumswechsel erfolgte alle 1-2 Tage oder bei Farbwechsel des Mediums von rötlich nach gelblich.

Alle Zellkulturarbeiten erfolgten unter sterilen Arbeitsbedingungen. Die FBS Hitzeinaktivierung erfolgte durch Inkubation für 30 min bei 56 °C. Kulturmedien und Reagenzien wurden vor ihrem Einsatz auf 37 °C vorgewärmt.

### **2.4.2 Kryokonservierung und Kryokultivierung eukaryotischer Zellen**

Zur Kryokonservierung wurden  $2 \times 10^6$  Zellen in 1 ml Konservierungsmedium (70 % DMEM, 20% FCS (PAA, Pasching) und 10 % DMSO) aufgenommen, in Kryoröhrchen (Ratiolab, Dreieich) für 24 h in einem Kryokonservierungskontainer (Nalgene Labware, Rochester, USA) (zur langsamen Abkühlung) auf -80 °C gekühlt und in flüssigem Stickstoff gelagert.

Um kryokonservierte Zellen in Kultur zu nehmen, wurden diese nach schnellem Auftauen sofort mit 5 ml vorgewärmten Kulturmedium (2.4.1) versetzt, bei RT für 5min bei 300 g pelletiert, in 5 ml frischem Kulturmedium resuspendiert und in eine Zellkulturflasche (25 cm<sup>2</sup>, Greiner Bio-One, Essen) überführt und bei Erreichen von Konfluenz passagiert.

### **2.4.3 Transiente Transfektion mit Plasmid-DNA**

Die transiente Transfektion von HeLa und HEK 293T Zellen mit Plasmid-DNA erfolgte entweder mit Nanofectin (PAA, Pasching, Österreich) oder über Elektroporation mittels Amaxa-Nukleofektor Gerät (Amaxa/Lonza, Köln) mit Nukleofektionslösung R (Lonza, Köln) entsprechend der Herstellerangaben. Bei der Nanofektion wurden die Zellen in 6 Lochplatten (Greiner Bio-One, Essen) bei einer Dichte von 70-80 % mit 200 µl Transfektionsreagenz (200 µl: 150 mM NaCl mit 9,6 µl Nanofektin) mit 1,5 µg Plasmid-DNA pro Loch (well) transfiziert, gefolgt von einem Mediumswechsel nach 5 h. Die Transfektion mit Amaxa Elektroporation wurde mit  $1 \times 10^6$  Zellen pro Transfektion durchgeführt, wobei die Zellen nach Zentrifugation und Entfernung des Überstands in 100 µl Nukleofektion Lösung R bei RT resuspendiert wurden und 2 µg Plasmid-DNA zugegeben und das Gemisch in eine Spezialküvette überführt und unter Programm 0-005 im Amaxa Nukleofektor Gerät elektroporiert wurde. Danach wurden sofort 500 µl vorgewärmtes Medium zugegeben und die Zellen in einem Endvolumen von 1,5 ml pro Loch einer 6 Lochplatte ausgesät. Die Transfektionen mit unterschiedlichen Vektorkonstrukten wurden mit entsprechenden, gleichen molaren Mengen durchgeführt.

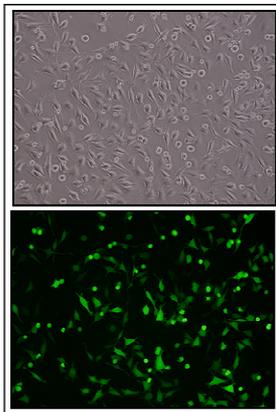
## 2.5 Bionas System – online monitoring der Bioaktivität von Proteinen

Um ein realtime monitoring des Einflusses einzelner überexprimierter Proteine und des Einflusses deren SNP Mutanten auf den Energiemetabolismus in lebenden Zellen zu ermöglichen wurde die Methode der transienten Transfektion (2.4.3) in leicht abgewandelter Form (2.5.1) mit dem Bionas-System, einem Biosensor-Chip-System (2.5.2) kombiniert (Abbildung 10).

### TRANSIENTE TRANSFEKTION

-> Identifizierung optimaler Zelllinie und Transfektionsmethode:

HeLa Zellen transfiziert mit Amaxa / Nanofectin



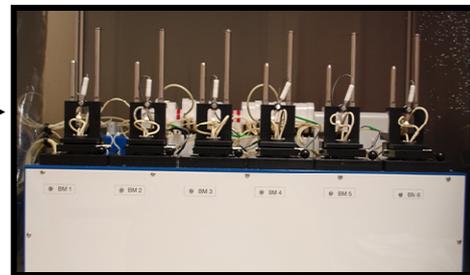
Aussaat auf Biosensor-chip



← Transfektionseffizienz-Kontrolle - GFP

### BIONAS MESSUNG

-> online monitoring des zellulären Metabolismus



**Abbildung 10: Überblick über Methode der Messungen des Einflusses überexprimierter Proteine auf den Zellmetabolismus im Bionas System.**

### 2.5.1 Transfektion in Biosensor Chips

Bei der Transfektion von HeLa Zellen für anschließende Messung im Bionas System (Abbildung 10) wurden 450  $\mu\text{l}$  (ca.  $3 \times 10^5$  Zellen) der Transfektionsansätze (2.4.3) in die Biosensor Chips ausgesät, welche für 5 min mit poly-D-Lysin beschichtet wurden. Nach 5 h wurde ein Mediumswechsel mit nur 5 % FCS durchgeführt, um die Zellen an die Bedingungen mit reduziertem FCS für die Bionas Messungen zu adaptieren. Für die Messungen im Bionas System wurde die FCS Konzentration auf 2,5 % gesenkt, da durch reduzierte FCS Konzentration die Zellproliferation gesenkt wird, welche bei längeren Analysen die Messungen stören würde.

### 2.5.2 Bionas System, ein Biosensor-Chip System

Zur Etablierung der Methode wurde aufgrund seiner Schlüsselrolle im Energiemetabolismus SIRT3WT eingesetzt.

Die Biosensor Chips SC1000 (Bionas, Rostock) wurden mit 500 µl PBS gewaschen, mit 70 % EtOH desinfiziert und mit 100 µl Poly-D-Lysin beschichtet, wozu 5 min inkubiert und dann 3 mal mit autoklaviertem dd H<sub>2</sub>O gewaschen und 2 h getrocknet wurde. Vor jedem Experiment wurde das Schlauchsystem des Bionas 2500 Systems (Bionas, Rostock) desinfiziert durch Spülung mit 70 % EtOH und Waschen mit PBS, gefolgt von abschließender Spülung mit Bionas Medium (Bionas, Rostock; entspricht DMEM gepuffert mit 1mM HEPES statt Karbonat Puffer; mit nur 2,5 % FCS und 1g / L Glukose). In die beschichteten Biosensor Chips wurden entweder  $3 \times 10^5$  untransfizierte oder transfizierte (wtSIRT3, SIRT3<sub>R80W</sub>, SIRT3<sub>V208I</sub>, wtSIRT1 vgl. 2.2.1 und 2.5.1) HeLa-Zellen (entsprach 80-90 % Konfluenz) in 450 µl Bionas Medium ausgespäht und nach 4 bzw. 24 h Inkubation im Brutschrank in das Bionas System überführt und für 2 h bzw. 48 h bei den Kinetikanalysen vergleichend auf Respiration, Glykolyse und Adhäsion analysiert. Dabei wurde das Bionas Medium über angeschlossene Schläuche und Pumpen kontinuierlich ausgetauscht, in Zyklen von je 4 min Mediumsaustausch und 4 min Inkubation, während welcher jeweils die Messungen der Chipsensoren („Clark-Typ Sauerstoff Sensoren“, welche den Sauerstoffverbrauch erfassen, sowie „Ionensensitive Feld-Effekt Transistoren“ zur Messung von pH Änderungen und „impedimetrische fingerartig verflochtene Elektroden Strukturen“ für die Messung der Impedanz (Ehret, *et al* 2001), vgl. Abbildung 10) durchgeführt wurden.

Die vergleichenden Analysen des Einflusses überexprimierter Proteine und ihrer Mutanten (wtSIRT3, SIRT3<sub>R80W</sub>, SIRT3<sub>V208I</sub>, wtSIRT1 vgl. 2.2.1 und 2.5.1) auf den Zellmetabolismus bzw. die beschriebenen Parameter wurden nach Transfektionen äquimolarer Mengen der entsprechenden eukariotischen Plasmidkonstrukte durchgeführt, wobei eine Normalisierung der Werte unter Berücksichtigung des Anstiegs der Zellzahl erfolgte (prozentualer Anstieg der Zellzahl wurde von prozentualer Anstieg der Respiration abgezogen) und die Werte (Anstiege) der mit den zu analysierenden SNP Konstrukten transfizierten Zellen mit den Werten der Kontrollen, untransfizierten und mit Leervektor und inaktivierten Konstrukten transfizierten Zellen abgeglichen wurden.

## 2.6 Patienten und primäre Proben

Für die Genexpressionsanalysen konnte RNA aus Primärproben von 55 AML-Patienten (38 Männer und 17 Frauen im Alter von 13 bis 72 (Durchschnitt: 43,3 Jahre)), mit den AML-Subtypen (French-american-british (FAB)): M0, M1, M2, M4, M4/E0, M5a, M5b untersucht werden. Für die SNP Analysen der Klasse I HDACs wurden DNA Proben von 279 AML Patienten eingesetzt (Tabelle 14) und für die SNP Analysen in Ara-C metabolisierenden Enzymen DNA Proben von 360 AML Patienten (Tabelle 17).

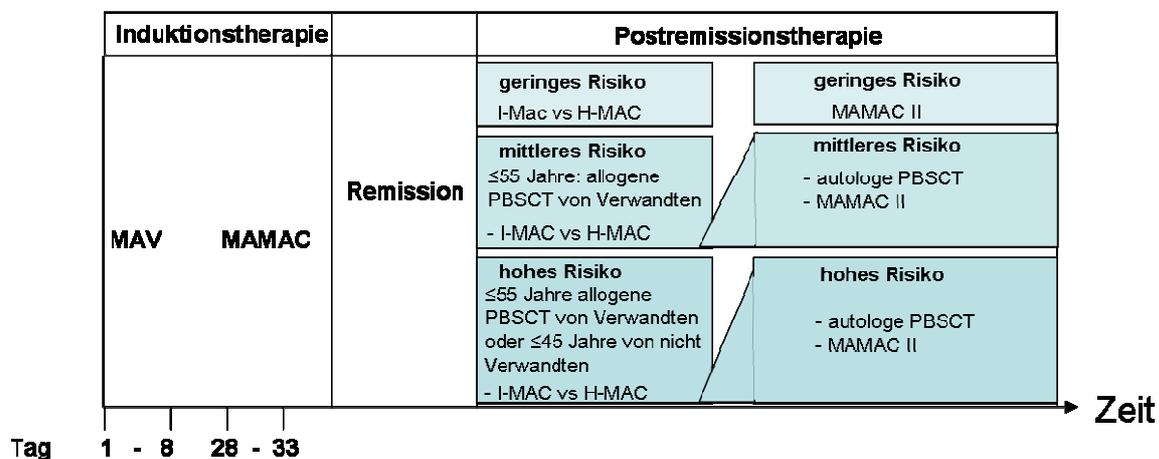
Sowohl die Patientenproben der Genexpressionsanalysen, als auch der SNP Analysen stammen aus der AML96 Studie (NCT 00180102) der DSIL, Deutsche Studieninitiative Leukämie, (Schaich, *et al* 2001). Dabei wurden die einbezogenen Patienten zwischen 1996 und 2003 behandelt und die durchschnittliche Beobachtungszeit betrug 6,2 Jahre (4,3 – 9). AML M3 (akute promyelozyten Leukämie) war in dieser Studie nicht einbezogen und wurde in anderen Studien analysiert.

Die Proben waren bei den experimentellen Arbeiten verblindet und wurden erst bei der Datenkorrelation durch die Kooperationspartner in Dresden entblindet.

Alle Patienten wurden im Rahmen des deutschen Multizenter-Protokolls der Süddeutschen Hämoblastosegruppe (SHG) behandelt. Das Behandlungsschema wurde 2001 veröffentlicht ((Schaich, *et al* 2001), Abbildung 11, sowie (Mahlknecht, *et al* 2009)).

Patienten über 60 Jahre erhielten zwei Induktionstherapien mit Daunorubicin  $45 \text{ mg/m}^2$  (Tag 3-5) und Ara-C  $100 \text{ mg/m}^2$  (Tag 1-7), sowie bei kompletter Remission eine Postremissionstherapie mit MAMAC, d.h. Amsakrin ( $100 \text{ mg/m}^2$  1 h iv (2 h nach Ara-C) und Ara-C (2 mal  $1000 \text{ mg/m}^2$  2 h iv). Patienten unter und einschließlich 60 Jahre erhielten ebenfalls zwei Induktionstherapien mit MAV von Tag 1-8, d.h. Mitoxantron ( $10 \text{ mg/m}^2$  intravenöse (iv) Kurzzeitinfusion (KI) Tag 4-8), Ara-C ( $100 \text{ mg/m}^2$  24 h iv) Tag 1-8, VP 16 (Etoposid) ( $100 \text{ mg/m}^2$  iv KI) Tag 4-8, sowie als zweite Induktionstherapie am Tag 28 für 5 Tage mit MAMAC (s.o.). Weiterhin erhielten sie Postremissionstherapien in Abhängigkeit ihrer zytogenetischen Risikogruppe (basierend auf Zytogenetik) wie in Abbildung 11 dargestellt, welche, wie die Induktionstherapien, ebenfalls Ara-C beinhalteten. Patienten mit mittlerem Risiko erhielten eine allogene Stammzelltransplantation (PBSCT), wenn möglich von einem Geschwisterteil mit identischem HLA System (humanes Leukozyten-Antigen System). Ansonsten erhielten sie, wie auch Patienten mit geringem Risiko, randomisiert eine mittlere (2 mal  $1000 \text{ mg/m}^2$  alle 12 h von Tag 1–6 (I-MAC)) oder hochdosis (2 mal  $3000 \text{ mg/m}^2$  alle 12 h von Tag 1–6 (H-MAC)) Ara-C mit Mitoxantron ( $10 \text{ mg/m}^2$  von Tag 4-6), woran sich eine autologe PBSCT (bei mittlerem zytogenetischen Risiko) oder MAMAC (bei geringem zytogenetischen Risiko)

anschloss. Patienten mit hohem zytogenetischen Risiko erhielten eine allogene Stammzelltransplantation von Verwandten mit der Option auf eine Stammzelltransplantation von nicht Verwandten.



**Abbildung 11: Therapieschema der deutschen SHG AML 96 Studie für AML Patienten unter 60 Jahren.** Postremissionstherapie mit I-MAC; H- MAC; MAV / MAMAC siehe Text; (Abbildung in Anlehnung an (Schaich, et al 2001))

Die Studie wurde durch die lokale Ethik-Kommission genehmigt und war in Einklang mit der Deklaration von Helsinki (und unter der NCT Nummer 00180115 registriert). Alle Patienten und Probanden gaben ihr schriftliches Einverständnis ab.

### 2.6.1 Methoden bei der Probenaufarbeitung

Die Methoden zur Probenaufbereitung der Patientenproben, wie die Isolierung der DNA (2.7.8) und RNA (2.7.8.3) und die FACS (2.6.1.1) und zytogenetischen Analysen (2.6.1.2) wurden von unseren Kooperationspartnern in Dresden (Prof. Schaich und Mitarbeiter, 10) durchgeführt.

Die zur DNA Isolierung und den Analysen verwendeten peripheren Blutproben von 360 AML Patienten (Tabelle 17) wurden den Patienten zum Diagnosezeitpunkt entnommen und für die Routineanalysen, zytogenetische und immunozytochemische Analysen aufgeteilt. Die DNA und RNA Isolierung (2.7.8) der Patientenproben, sowie die RNA Isolierung der Kontrollproben der Genexpressionsanalysen (3.1, 2.7.10) erfolgte hierbei aus peripheren mononukleären Blutzellen (PBMCs) nach Dichte-Gradienten Zentrifugation (BIOCOLL, Biochrom, Berlin) entsprechend den Herstellerangaben.

Die genomische DNA von 800 Kontrollproben gesunder Probanden (Kontrollen bei den SNP Analysen) wurde aus 5ml peripherem EDTA Blut mittels Aussalzen (2.7.8.1) extrahiert.

### 2.6.1.1 Durchflusszytometrie

Die Diskriminierung CD34 positiver Zellen erfolgte per FACS Analyse mittels CD34 monoklonalem Antikörper QBEnd10 (Coulter, Hamburg) entsprechend den Herstellerangaben, wie in (Gramatzki, *et al* 1998) beschrieben.

### 2.6.1.2 Zytogenetik

Die Chromosomenanalyse zur Analyse der Zytogenetischen Aberrationen der AML Patienten, die bei den Korrelationsanalysen der SNP (2.7.11) und Genexpressionsanalysen (2.7.10) mitbezogen wurden, wurden ebenfalls von den Kooperationspartnern (Prof Schaich und Mitarbeitern) durchgeführt (Mahlknecht, *et al* 2009). Dabei wurden in der Metaphase direkte Präparationen von 24 und 48 h Kulturen von peripheren Blutproben und Chromosomenanalysen, wie die Analyse von FLT3-ITD und NPM1 Mutationen durchgeführt, wie in (Mohr, *et al* 2000) beschrieben. Dabei erfolgten die zytogenetischen Präparationen und Giemsa-Bänderung entsprechend Standardlabormethoden.

Bei den Korrelationen der Genexpressionsanalysen wurden besonders die zytogenetischen Gruppen Inversion(16) und t(8/21) (geringes Risiko), Monosomie 7/del(7q) (hochrisiko Gruppe) und Standardrisiko (normaler Karyotyp und chromosomale Aberrationen, die nicht in hoch oder niedrig Risikogruppe fallen) in die Korrelationsanalysen einbezogen.

## 2.7 Molekularbiologische Methoden

### 2.7.1 Aufreinigung von Plasmid-DNA

Die Plasmid-DNA-Aufreinigung basierte auf dem Prinzip der Alkalischen Lyse (Birnboim and Doly 1979). Um Plasmid-DNA (für Sequenzierungen oder Charakterisierungen mittels Restriktionsverdau (2.7.2) und Gelelektrophorese (2.7.5)) aufzureinigen, wurden aus einer ü.N. Kultur eines Klons in 5 ml LB-Medium mit Ampicillin oder Kanamycin (bei 37 °C und 220 U/min) 4 ml mit dem NucleoBond® Plasmid Purification-Kit (Macherey & Nagel, Düren) nach Herstellerangaben aufgereinigt. Die Eluierung erfolgte in 50 µl 10 mM Tris-HCl (pH 8) und die Ausbeute lag je nach Plasmid zwischen 200 –800 ng/µl.

Um eine größere Menge Plasmid-DNA für Transfektionen und Archivierungen zu erlangen wurde die Plasmid-DNA aus 200 ml einer ü.N.-Kultur mit Hilfe des NucleoBond® AX 500

Kit (Macherey&Nagel, Düren) nach Herstellerangaben aufgereinigt und in 100 µl 10 mM Tris-HCl (pH 8) gelöst und bei -20 °C gelagert. Dabei lag die DNA-Ausbeute bei 2-4 µg/µl.

### **2.7.2 Restriktion von DNA Fragmenten**

Zur Kontrolle isolierter Plasmid-DNA bzw. der Orientierung des Inserts, sowie zur Präparation von DNA-Fragmenten für Klonierungen (Aufreinigung/Gelextraktion geschnittener Vektoren oder Inserts (2.7.5), Ligationen (2.7.4)) wurde die DNA mit Hilfe von Restriktionsenzymen (Fermentas, Mannheim oder New England Biolabs, Schwalbach/Taunus) gespalten.

Pro Reaktionsansatz wurden 500 ng DNA bzw. 5 µl gereinigte Plasmid-DNA, 10 U Enzym und 2 µl des geeigneten 10x Puffers in einem Gesamtvolumen von 30 µl 1-2 h (Einzel- oder Doppelverdau) bei 37 °C – inkubiert (Dabei ist eine Unit (U) die Enzymaktivität, die 1 µg λ-Phagen-DNA in 60 min unter optimalen Bedingungen vollständig spaltet). Um unspezifische (*Star*)-Aktivitäten zu vermeiden, sollte das Volumen der Enzymlösung dabei nicht mehr als 10 % des Gesamtansatzes ausmachen. Der Reaktionsansatz wurde dann mittels Agarosegelelektrophorese aufgetrennt (2.7.5).

### **2.7.3 Dephosphorylierung von DNA-Fragmenten**

Zur Vermeidung von Religation des linearisierten Vektors und entsprechender Steigerung der Ausbeute an rekombinanten Plasmiden, wurde die 5'-Phosphatgruppe durch Behandlung mit alkalischer Phosphatase abgespalten. Die aufgereinigte Plasmid-DNA (30 µl, 2.7.1) wurde dazu für 20 min. mit 10 U Alkalische Phosphatase (CIP, New England Biolabs, Schwalbach/Taunus) inkubiert, welche anschließend durch Aufreinigung mit dem Qiaquick PCR-Purification Kit (Qiagen, Hilden) entfernt wurde.

### **2.7.4 Ligation von DNA-Fragmenten**

Die Ligation von DNA-Fragmente erfolgte in den molaren Verhältnissen von Vektor zu Insert von 1 zu 1 bis 3 zu 1. Das Reaktionsvolumen betrug 20 µl und enthielt 50 - 75 ng Vektor-DNA, 20 U T4-DNA-Ligase und 1 x T4-DNA-Ligase-Puffer (je New England Biolabs, Schwalbach/Taunus). Die Reaktion erfolgte ü.N. bei 16 °C im Thermocycler (Cetus, Perkin Elmer).

### 2.7.5 Agarose-Gelelektrophorese

Zur Kontrolle auf vollständige Ligation oder Restriktion mit entsprechend richtigen Fragmentgrößen, sowie Kontrolle der Reinheit isolierter RNA (2.7.8.3) oder von PCR Produkten (2.7.9) wurden Proben per Agarose-Gelelektrophorese aufgetrennt.

Die Methode basiert auf den Wanderungseigenschaften der Nukleinsäuren, die durch ihre negativ geladenen Phosphatgruppen bei angelegter elektrischer Spannung in Richtung Anode wandern, wobei ihre Wanderungsgeschwindigkeit proportional zur angelegten Spannung ist und neben ihrer Größe auch vom Salzgehalt des verwendeten Puffers und ihrer Konformation (linearisiert, superhelikal, einzel- oder doppelsträngig) abhängt. Die Agarosekonzentration bestimmt über die Porengröße des auspolymerisierten Netzwerkes aus unterschiedlich verknüpften Galaktoseeinheiten den effektiven Trennungsbereich und es können Nukleinsäuren zwischen 0,1 und 60kb aufgetrennt werden (Sambrook, *et al* 2001). Je nach gewünschter Konzentration des Gels (1% Agarose für große Nukleinsäuremoleküle), wurde eine entsprechende Menge Agarose in 0,5 x TBE-Puffer (1 fach aus 10 fach Stock: 90 mM Tris, 90 mM Borsäure, 20 mM EDTA pH 8) aufgekocht (schlierenfrei) und nach Abkühlen auf ca. 40°C und Zugabe von Ethidiumbromid (Endkonzentration von 50 ng/ml) zur Nukleinsäure Detektion in einer Gelkammer (Peqlab, Erlangen) auspolymerisiert.

Jeder Probe wurde je 1/6 Volumen DNA Ladepuffer 6x Loading Dye (Fermentas, St. Leon Rot) bzw. 1/5 Volumen RNA-Ladepuffer (5-fach: 50 % Glycerin, 0,25 % Bromphenolblau, 0,25 % Xylencyanol, 1 mM EDTA pH 8) versetzt, aufgetragen und mit einem geeigneten Molekulargewichtsstandard (z.B. 1 kb DNA-Marker (Invitrogen, Schwalbach/Taunus)) bei 10 V/cm Elektrodenabstand für ca. 1 h aufgetrennt (Apparatur: Peqlab, Erlangen). Die Auswertung erfolgte per UV-Durchlichtschirm (Bachofer Laboratoriumsgeräte, Reutlingen) bei einer Wellenlänge von 312 nm und Dokumentation mit einer Kamera (E.A.S.Y. 429K, Herolab Molekulare Trenntechnik, Wiesloch). Die entsprechenden Banden präparativer Reaktions- oder Ligationsansätze wurden bei 365 nm (UV Durchlichtschirm, Syngene, Langenfeld) ausgeschnitten und mit Hilfe des Gel-Extraktions-Kits (Qiagen, Hilden) nach Herstellerangaben aus dem Gel aufgereinigt.

### 2.7.6 Nukleinsäurekonzentrationsbestimmung

Die DNA und RNA Konzentrationsbestimmung erfolgte durch Messung am Nanodrop ND-1000 Spectrophotometer (Peqlab Biotechnologie GmbH, Erlangen), welcher kleinste Volumen von 1-2 µl vermessen kann. Die Messung beruht dabei auf Bestimmung der optischen

Dichte bei 260 nm ( $OD_{260}$ ), sowie 280 nm, wobei die Reinheit durch Bildung des Quotienten aus  $OD_{260}$  und  $OD_{280}$  ermittelt wird. Reine DNA bzw. RNA sollte einen Quotienten von 1,8 bzw. 2,0 aufweisen, wobei eine Verunreinigung mit Proteinen und Phenol durch Werte unter 1,8 angezeigt wird.

### 2.7.7 DNA-Sequenzierung

Die Sequenzierungen der verwendeten Plasmide wurde von der Firma MWG Biotech (Martinsried) nach der Didesoxyribonucleotid-Methode nach Sanger durchgeführt (Sanger, *et al* 1977) durchgeführt. Ein Sequenzierungsansatz beinhaltete 2-3  $\mu$ g der aufgereinigten Plasmid-DNA (2.7.1) in 20  $\mu$ l 5 mM Tris-HCl pH 8 und entsprechende Primer (10  $\mu$ M in 10  $\mu$ l), die falls nicht von MWG Biotech bereitgestellt, nach eigenem Primerdesign (Standard Primerkriterien (GC Gehalt 50 – 60 %, Länge 15 – 25bp, nicht komplementär zueinander,...)) mit dem Programm Primer-Blast von NCBI von der Firma Sigma-Aldrich (Deisenhofen) nach vorheriger Kontrolle auf gleiche unspezifische Bindestellen im menschlichen Genom (mittels genomic BLAST von NCBI) hergestellt wurden (2.2.2).

### 2.7.8 DNA-, RNA-Isolierung und cDNA Synthese

#### 2.7.8.1 DNA Isolierung mittels Aussalzen

Die DNA aus 800 gesunden kaukasischen Probanden wurde aus 5ml peripherem Blut (EDTA-Blut) durch Aussalzen isoliert.

Zur Lymphozytenpräparation wurden am ersten Tag der DNA Isolierung 5 ml Vollblut in ein 50 ml (Falcon-) Röhrchen überführt, die 3-fache Menge an Lysepuffer (10 x Stocklösung: 8,05 g Ammoniumchlorid ( $NH_4Cl$ ), 1 g Kaliumhydrogenkarbonat ( $KHCO_3$ ), 200  $\mu$ l 0,5 M EDTA auf pH 7,4; auf 1 l mit dd  $H_2O$  auffüllen; autoklavieren) hinzu gegeben und ohne schütteln gemischt. Nach 30 - 45 min auf Eis (Lyse der Zellen) wurde 10 min bei 1500 rpm zentrifugiert, der Überstand verworfen und das Pellet in 10ml Lysepuffer resuspendiert. Nach erneuter Zentrifugation wurde das entstandene Lymphozytensediment 2 mal in 5ml SE-Puffer (8,78 g Natriumchlorid ( $NaCl$ ), 16,82 g Natrium EDTA ( $Na_2$  EDTA) pH 8,0 einstellen und auf 2 l mit dd  $H_2O$  auffüllen) resuspendiert und 10 min bei 1500 rpm zentrifugiert. Jede Probe wurde dann mit 20  $\mu$ l Proteinase K (25mg/ml) versetzt und 200  $\mu$ l 20 %ige SDS-Lösung zugegeben und bis zur Bildung einer homogenen zähflüssigen Masse gemischt und ü.N. bei 37°C im Wasserbad inkubiert.

Am 2. Tag erfolgte die Präzipitation der DNA. Nachdem die Proteine verdaut waren (Zähflüssigkeit weg und klare Flüssigkeit) wurden 2 ml 6M NaCl-Lösung zugegeben und 20 sek mit Maximalgeschwindigkeit geschüttelt, bis sich ein weißer Schaum bildete. Nach 10 min Zentrifugation bei 3500 rpm, wurde der Überstand in ein neues 15 ml Röhrchen überführt. Der Vorgang des Zentrifugierens und Abgießens wurde 3-5 mal wiederholt, bis der Überstand klar war. Dann wurden 2 Volumen eiskaltes 100 % Ethanol vorsichtig zugegeben und vorsichtig geschwenkt bis sich eine DNA-Flocke bildete, welche mit einer gebogenen Glaspipette rausgefischt, in 70 % Ethanol gewaschen, kurz lufttrockenen gelassen und in ein neues Eppendorf Tube überführt, in welches, abhängig von der Flockengröße etwa 100 – 300 µl 10 mM Tris-Puffer pH 7,5 zugegeben wurde. Die DNA wurde ü.N. auf einem Schüttler bei 4°C gelöst und abschließende vermessen (2.7.6).

### **2.7.8.2 DNA Isolierung mit Phenol/Chlorophorm Extraktion**

Die DNA Isolierung aus den über Dichte-Gradienten Zentrifugation ((BIOCOLL, Biochrom, Berlin) entsprechend den Herstellerangaben) isolierten PBMCs der AML Patientenproben erfolgte mittels Standard Phenol/Chlorophorm Extraktion und mittels Qiagen DNA-Extraktions Kit (Qiagen, Hilden) (Schaich, *et al* 2001) entsprechend Herstellerangaben.

### **2.7.8.3 RNA-Isolierung und cDNA Synthese**

Die RNA der Kontrollproben und der 55 AML Patienten für die Genexpressionsanalysen (2.7.10, Link zu Ergebnisteil) wurden aus PBMCs nach Dichte-Gradienten Zentrifugation ((BIOCOLL, Biochrom, Berlin) entsprechend den Herstellerangaben) isoliert, welche den Patienten vor Behandlungsbeginn in der AML 96 Studie entnommen wurden.

Die RNA wurde aus Heparin-Blut mit dem RNazol-Kit (Paesel, Frankfurt) entsprechend den Herstellerangaben isoliert (Schmidt, *et al* 1998) und die anschließende cDNA Synthese erfolgte mit 5 µg Gesamt-RNA in einem Volumen von 50 µl unter Verwendung des „High Capacity cDNA Reverse Transcription Kit“ (Applied Biosystems, Darmstadt) nach Herstellerangaben. Die cDNA wurde 1 zu 10 verdünnt und 2 µl je PCR Reaktion (2.7.10) eingesetzt.

### **2.7.9 PCR - Polymerase-Kettenreaktion**

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR – polymerase chain reaction) ist eine hochsensitive und hochspezifische exponentielle Amplifikationstechnik zur *in vitro* Untersuchung einer DNA-Zielsequenz (Saiki, *et al* 1988). Voraussetzung für die Vervielfältigung von bestimmten DNA-

Sequenzen ist die Bindung von spezifischen Oligonukleotiden, die als Startmoleküle (Primer) für DNA-Polymerasen dienen. Die PCR stellt eine polyzyklische Reaktion dar, die in jedem Zyklus drei Schritte von Denaturierung der DNA, Primeranlagerung und Primerverlängerung durch die hitzestabile Taq-DNA-Polymerase durchläuft.

### 2.7.9.1 Mutagenese PCR

Mittels Mutagenese PCR mit einem Mutagenese PCR Kit (QuikChange site directed mutagenesis Kit; Stratagene, Cedar Creek) in einem programmierbaren Thermocycler (Robocycler Gradient 96; Stratagene, Cedar Creek) und wurden mit entsprechenden Primern (2.2.2) gezielte Aminosäureveränderungen in SIRT3 eingefügt (entsprechend identifizierter SNPs und zur Inaktivierung (3.3)). Bei der Durchführung entsprechend Herstellerangaben wurde der *DpnI*-Verdau methylierter, parentaler Plasmid-DNA auf 15 min gekürzt, weil bei 60 min Verdau keine Kolonien selektiert werden konnten und den PCR-Ansätzen wurde zur Optimierung zusätzlich 5% DMSO, 5% Glycerol, sowie 5% Formamid zugesetzt. Nach vorheriger Plasmid-Präparation (2.7.1) mittels DNA-Sequenzierung (2.7.7) wurden die eingefügten Mutationen verifiziert.

### 2.7.10 Real-time-PCR

Mittels „Real time PCR“, einer PCR Reaktion, bei der anhand von Fluoreszenzsignalen, welche parallel und proportional zu dem entstandenen PCR Produkt ansteigen, Rückschlüsse auf die Expressionsstärke (mRNA Menge) von Genen getroffen werden kann, wurden vergleichende Genexpressionsanalysen bestimmter Gene bei AML Patienten gegenüber gesunden Probanden durchgeführt (3.1). Dabei wurden Genexpressionsassays der Firma Applied Biosystems (Darmstadt) an einem TaqMan PCR Gerät (ABI PRISM 7700, Applied Biosystems) entsprechend den Herstellerangaben eingesetzt. Die Genexpressionsassays bestehen neben den genspezifischen, unmarkierten Primern auch noch aus einer zielgenspezifischen Sonde, welche am 5'-Ende mit einem Fluoreszenzsignal (FAM, Fluorescein) und am 3'-Ende mit einem „Quencher“ markiert ist, welcher bei Intaktheit der Sonde das Fluoreszenzsignal über das FRET-Prinzip (Fluoreszenz Resonanz Energie Transfer) auslöscht. Bei der Amplifikation des Zielgens wird die Sonde durch die Exonuklease Aktivität der DNA-Polymerase abgebaut und durch die räumliche Trennung von Fluoreszenzsonde und „Quencher“ kommt es zur Freisetzung und Anstieg des Fluoreszenzsignals.

Die Quantifizierung ergibt sich durch Vergleich der Reaktionszyklen, die benötigt werden, um eine Fluoreszenzintensität zu erzeugen, welche einen bestimmten Grenzwert  $C_t$  (Cycle threshold, in Zyklenbereich, in dem sich alle Proben noch in der exponentiellen Phase befinden) überschreitet. Der  $C_t$ -Wert entspricht der Zyklenzahl, bei welcher der festgelegte Grenzwert überschritten wird. Die Methode ermöglicht einen relativen Vergleich der einzelnen Proben zueinander. Eine Probe mit mehr Kopien eines „Templates“ (Matrize, cDNA), erreicht den Grenzwert früher als eine Probe mit weniger Templates, wobei eine Amplifikationsrunde der doppelten Menge an Template entspricht (Schmittgen, *et al* 2000), wodurch sich Genexpressionsunterschiede quantitativ erfassen lassen.

Die Reaktionsansätze wurden in 96-Lochplatten pipettiert, wobei jeder Reaktionsansatz (gesamt: 10  $\mu$ l) neben 0,5  $\mu$ l TaqMan® Gene Expression Assay (Applied Biosystems), (mit der Sonde und Primern) und 5  $\mu$ l eines 2-fach PCR-Master-Mix (2\* TaqMan PCR Amplification Mix, No AmpErase UNG, Eurogentec, mit dNTPs, Puffer, DNA Polymerase) und 2  $\mu$ l eines verdünnten cDNA Ansatzes (2.7.8.3), sowie 2,5  $\mu$ l DNase freies Wasser beinhaltete.

Die Genexpressionsanalyse im ABI PRISM 7700 erfolgte über 40 Zyklen mit je 15 sek 95 °C und 1 min 60 °C. Über die Herstellerseite ([www.appliedbiosystems.com](http://www.appliedbiosystems.com)) können mit Hilfe der Assay Nummern weitere Informationen zu den eingesetzten Genexpressionsassays (Hs00202021\_m1 (SIRT1), Hs00202030\_m1 (SIRT3), Hs00202033\_m1 (SIRT4), Hs00202043\_m1 (SIRT5), Hs00608357\_m1 (HDAC5); Hs00195869\_m1 (HDAC6) and Hs00402870\_m1 (HDAC9)) bezogen werden.

Als interne Kontrolle zur Normalisierung auf die eingesetzte cDNA Menge wurde die Expressionsstärke des Haushaltsgen *gapdh* mittels GAPDH-Assay (Applied Biosystems) bei jeder Probe mit bestimmt. Alle Messungen erfolgten in Triplikaten und wurden 3 - 4 mal wiederholt. Die Datenanalyse erfolgte mittels SDS 7700 Software (sequence detection system, Applied Biosystems). Die Expressionsstärke und die Expressionsveränderungen wurden mit Hilfe der  $2^{-\Delta\Delta C_t}$  Methode nach Livak und Schmittgen berechnet (Livak and Schmittgen 2001), wobei die gesunden Probanden (Durchschnitt) als Referenz benutzt wurde.

Der  $C_t$ -Wert des Zielgens wurde bei der relativen Quantifizierung gegen den  $C_t$ -Wert des Referenzgens (*gapdh*) normalisiert. Der normalisierte Wert wird als  $\Delta C_t$  bezeichnet.

$$\Delta C_t = C_{t_{Gen X}} - C_{t_{GAPDH}}$$

$$\Delta\Delta C_t = \Delta C_{t_{AML Patient}} - \Delta C_{t_{gesunde Probanden}}$$

$$\text{Relative Expression} = 2^{-\Delta\Delta C_t}$$

### 2.7.11 Allelspezifische TaqMan SNP-Assays

Die SNP Analysen bzw. Alleldiskriminierung (Bestimmung der Basen der Allele an einer bestimmten Stelle) erfolgte mit allelspezifischen SNP-Assays (Applied Biosystems) entsprechend den Herstellerangaben. Die SNP-Assays beruhen wie die Genexpressionsassays (2.7.10) auf einer PCR-Reaktion, wobei im Gegensatz dazu statt einer genspezifischen Sonde zwei allelspezifische Sonden mit zwei unterschiedlichen Fluoreszenzsignalen (FAM und TAMRA) eingesetzt werden. Die beiden allelspezifischen Sonden eines SNP Assays unterscheiden sich nur in einem Basenpaar. Während die nicht 100 % homologe Sonde beim Amplifikationsvorgang von der DNA-Polymerase verdrängt wird, bindet die 100 % homologe Sonde fest genug, um durch die Exonuklease Aktivität der DNA Polymerase zerschnitten zu werden, wodurch Fluoreszenzsignal und Quencher getrennt werden und das Fluoreszenzsignal freigesetzt wird.

Die Reaktionsansätze wurden in 96-Lochplatten (Applied Biosystems) pipettiert und nach Erhitzen der Reaktionsansätze (5 µl Gesamtvolumen: 2,5 µl „TaqMan® Gene expression Master Mix“, 0,25 µl SNP-Assay (alles von Applied Biosystems), sowie 2,25 µl DNA (2 ng/µl)) bei 95°C für 10 min wurden 40 Zyklen mit je 92°C für 15 s, 60 °C für 1 min im ABI PRISM 7700 (Applied Biosystems) durchgeführt. Dabei wurden die Fluoreszenzsignale von FAM und TAMRA relativ zu der Fluoreszenzintensität eines in jedem Ansatz vorhandenen Referenz Signal ROX ermittelt und als Rn-Werte angegeben. Um Fluktuationen der optischen Qualität der Reaktionsgefäße zu korrigieren, wurde die Signalstärke die vor der PCR gemessen wurde von der Signalstärke, die nach der PCR gemessen wurde, abgezogen.

Pro analysiertem SNP wurde bei jeder Platte zwei Negativkontrollen ohne DNA mitgeführt.

Die Zielsequenzen der verwendeten Sonden der Alleldiskriminierung sind (soweit bekannt gegeben) in (Tabelle 10) dargestellt.

**Tabelle 10: Sonden- / Zielsequenzen der SNP Analysen.**

SNP	Sonden- / Zielsequenz [VIC/FAM]
<b>HDAC1</b>	
rs11541183 (Ser150Phe)	TGACGTAACAG[G/A]AGCCA
rs11541185 (His33Asn)	CAATGAAGCCT[C/A]ACCGAA
<b>HDAC2</b>	
rs17852888 (His315Tyr)	TGCAGTCTCAT[A/G]TGTCCAA
rs1042903 (Ser230Arg)	TCATCTATACCATC[T/A]CTCATTG
rs1042902 (Stop230Arg)	CAATTTTCCAATG[A/T]GAGATG
rs1126963 (Ala103Val)	TCCATCAAAC[G/A]CTGGACA
<b>HDAC3</b>	

<b>C_25629707_10 (Asp408Ser)</b>	TCATAGAACTCA[ <b>C/T</b> ]TGGGTGCCT
<b>rs467744 (Pro265Arg)</b>	AAAGCAGCCCAAT[ <b>C/G</b> ]GATCACAG
<b>rs11546659 (Lys44Arg)</b>	TCTCTATAAGA[ <b>A/G</b> ]GATGATCG
<b>SIRT3</b>	
<b>rs7927733 (Intron 5 / Splice Stelle)</b>	TTTTTC[ <b>A/C</b> ]GGTG
<b>rs3020901 (Gly369Ser)</b>	ACGC[ <b>C/T</b> ]GTGA
<b>rs1734491 (Thr255Asp)</b>	ACTGTGCAG[G/T]TGGCAGAG
<b>rs1734492 (Arg214Gly)</b>	GAAGCAGCC[ <b>C/G</b> ]GAGAAAGTA
<b>rs11246020 (Val208Ileu)</b>	AGTGAGTGA[ <b>C/T</b> ]GTTGGGCT
<b>rs28365927 (Arg80Trp)</b>	CTGCCTCC[ <b>A/G</b> ]GAATGCCCT
<b>in Ara-C metabolisierenden Enzymen</b>	
<b>DCK</b>	
A727C	TATTTGTCTT[ <b>T/G</b> ]AAAGTC
C364T	ATGCAGAGAAA[ <b>C/T</b> ]CTGTA
<b>CDA</b>	
G208A	CGGACC[ <b>G/A</b> ]CTATCCAG
A79C	AGGAGGCCAAG[ <b>A/C</b> ]AGTCAGCC
G-88A	CACCCAAGGG[ <b>G/A</b> ]AGGAGCTGCA
A-92G	CTCCTCCCC[ <b>T/C</b> ]TGGGTG
C-451T	ATCCC[ <b>G/A</b> ]AGGCAGGAG
C-897A	ATTTACTCAG[ <b>G/T</b> ]CCCCCTC
<b>DCDT</b>	
A172G	AATTCAGAAAAC[ <b>A/G</b> ]AGATTGT

## 2.8 Proteinbiochemische und zellbiologische Methoden

### 2.8.1 Proteinisolierung - Gesamtzellysate

Zur Proteinisolierung wurden die Zellen mit PBS (Cambrex, Verviers, Belgien) gewaschen und nach Zugabe von 50 µl Passiv-Lysepuffer (50 mM Tris HCl (Roth, Karlsruhe) pH 7,5; 120 mM NaCl; 0,5 mM EDTA, 1 % Nonidet P40 und jeweils 1 mM PMSF frisch dazu gegeben) pro Loch einer 6-Lochplatte mit einem Zellschaber (Greiner Bio-One, Frickenhausen) abgelöst und in 1,5 ml Reaktionsgefäße überführt. Nach 20 min Inkubation auf Eis unter mehrfachen Schütteln wurden verbleibende Zellfragmente für 20 min bei 4 °C und 13000 rpm pelletiert und der klare Überstand mit den Proteinen in ein neues 1,5 ml Reaktionsgefäß überführt. Bei Zellen, die mit Flag-Vektoren transfiziert waren, schloss sich eine Immunpräzipitation (2.8.6) an. Ansonsten wurde die Proteinkonzentration bestimmt (2.8.3) und weitere Analysen mittels Western Blot (2.8.5) durchgeführt.

### 2.8.2 Histon Isolierung

Die Histon Isolierung erfolgte mittels Säureextraktion modifiziert nach (Jansen, *et al* 2004). Die Zellen wurden 24 h vor der Histon Isolierung zur Hemmung der Histon Deacetylierung bzw. Histon-Deacetylasen mit 25 nM Trichostatin A (TSA) und 5 mM Nikotinamid (NAM) inkubiert. Dann wurden pro Ansatz  $2 \times 10^6$  Zellen in 1,5 ml Reaktionsgefäßen mit PBS gewaschen und 200 µl Lysepuffer (10 mM Hepes, 10 mM KCl) pH 7,9; 1,5 mM MgCl<sub>2</sub> und 0,05 % Dithiothreitol (DTT) und 1 mM Phenylmethansulfonylfluorid (PMSF)) zugegeben. Dann wurde tropfenweise unter vorsichtigem Schütteln 50 µl of 2 M Schwefelsäure zugegeben und 1 h auf Eis inkubiert und alle 10 min geschüttelt. Nach Zentrifugation für 15 min bei 13000 rpm bei 4°C (Abtrennung unlöslicher Zellfragmente) wurde der Überstand in ein neues 2 ml Reaktionsgefäß überführt. Zur Präzipitation der Histone wurde das dreifache Volumen einer 20 % Trichloressigsäure zugegeben und für 1 h auf Eis inkubiert und alle 10 min geschüttelt. Dann wurde für 15 min bei 13000 rpm bei 4°C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Histonpellet wurde 2 mal mit 0,1 %-HCl-Acetonlösung (Aceton (Hedinger, Stuttgart) und dann 2 mal mit reinem Aceton gewaschen, luftgetrocknet und in 50 µl autoklaviertem ddH<sub>2</sub>O resuspendiert. Die Bestimmung der Histonkonzentration erfolgte durch Messung bei 230 nm und der Annahme, dass dabei eine Absorption von 4,2 bei 230 nm einer Konzentration von 1 µg/µl entspricht (Chung, *et al* 1978). Mit SDS-Gelelektrophorese und Coomassiefärbung (2.8.4) und Western-Blot mit Immundetektion (2.8.5) gegen Histon H4 gesamt (ab31827; Abcam, Cambridge, UK) und acetyliertes H4 Lys16 (Upstate Biotechnology, Hamburg) wurde die Aufreinigung hyperacetylierter Histone überprüft, welche dann als Substrate in den Deacetylierungsassays (Aktivitätstests) (2.8.7) eingesetzt wurden.

### 2.8.3 Bestimmung der Proteinkonzentration

Die Proteinkonzentrationsbestimmung wurde mittels DC Protein Assay von Biorad (München) durchgeführt, der im Wesentlichen auf dem Prinzip der Proteinbestimmung nach Lowry beruht [145]. Dabei wird die Proteinmenge über photometrische Messung einer Farbreaktion quantitativ bestimmt. Beim Lowry-Assay kommt es zur Komplexbildung von Cu<sup>2+</sup> Ionen mit je zwei Peptidbindungen nach Zugabe von Kupfersulfat zu der Proteinprobe im alkalischen Milieu (Puffer A). Durch anschließende Reduktion des Cu<sup>2+</sup> im entstandenen Kupfer-Protein-Komplex zu Cu<sup>+</sup> durch Reaktion des zugegebenen Folin-Ciocalteu-Phenol-Reagenz (Puffer B) mit Tyrosin, Tryptophan und z.T. auch mit Cystein, und Histidin der Proteine, kommt es zu Blaufär-

bung. Die Nachweisgrenze bei der Proteinbestimmung nach Lowry liegt bei 0,1-1µg Protein / ml.

Die Messung erfolgte in 96-well Platten gemäß Herstellerangaben, wobei 5 µl Probe, 25 µl der Lösung A' (20 µl Lösung S auf 1ml Puffer A), sowie 200 µl der Lösung B gemischt und für 20 min. bei RT inkubiert wurden. Die anschließende Messung der Extinktion bei 750 nm erfolgte im „Multiwell-Plate-Reader“ Vmax (Molecular Devices, Ismaning). Die Standardkurve wurde mit definierten BSA-Konzentrationen erstellt.

### 2.8.4 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese

Bei der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) werden Proteine ihrer Größe entsprechend aufgetrennt, da das enthaltene stark negativ geladene Detergens SDS an hydrophobe Regionen der Proteinmoleküle bindet und die Ladungen der Proteinseitenketten überdeckt, wodurch diese sich zu gestreckten Polypeptidketten entfalten, aus Assoziationen mit anderen Proteinen entlassen werden und im elektrischen Feld zur Anode wandern. Außerdem wird die reduzierende Substanz β-Mercaptoethanol zugesetzt, die alle Disulfidbindungen im Protein löst, so dass Polypeptide, die ein aus mehreren Untereinheiten bestehendes Proteinmolekül aufbauen, getrennt analysiert werden können. Um gute Qualität definierter Banden zu erhalten, werden bei der diskontinuierlichen SDS-Gelelektrophorese zwei aufeinander folgende Gele unterschiedlicher Dichte und pH-Werte (Trenn- und Sammelgel) verwendet (nach (Laemmli 1970)).

Der Aufbau der Gelapparatur erfolgte gemäß Herstellerangaben (*Mini Protean II Vertikal Elektrophorese System*; Biorad, München). Zur Vorbereitung wurden die Proteinproben je nach Ausgangsvolumen entweder mit zweifach oder fünffach konzentriertem SDS-Probenpuffer (225 mM Tris-HCl (pH 6,8), 50 % Glycerol (v/v), 5 % SDS (w/v), 0,05 % Bromphenolblau (w/v), 250 mM DTT) versetzt, 5 min. bei 95 °C aufgeköcht und kurz abzentrifugiert.

Das Trenngel (10 % (größere Proteine) bzw. 15 % (kleinere Proteine, Histone): 1,9 ml Tris-HCl / SDS (1 M, pH 8,8 / 0,4 %), 2,5 bzw. 3,75 ml Acrylamid-Stammlösung (30 % Acrylamid: 0,8 % Bis-Acrylamid), 3 bzw. 2 ml dd Wasser, 10 µl TEMED, 50 µl des Radikalstarters APS (10 %)) wurde mit 1 ml Isopropanol überschichtet, welches nach 30 min Polymerisation vor Gießen des Sammelgels mit Wasser wieder entfernt wurde.

Nach anschließendem Gießen des Sammelgels (600 µl Tris-HCl / SDS (1 M, pH 6,8 / 0,4 %), 400 µl Acrylamid-Stammlösung (30 % s.o.), 1,5 ml dd Wasser, 5 µl TEMED, 25 µl APS), Einfügen der Kämme und nach 30 min Inkubation wurde die Gelvorrichtung in die E-

lektrophoresekammer eingesetzt und die Pufferkammer mit 1 x Elektrophorese Laufpuffer (125 mM Tris/HCl (pH 7,5), 190 mM Glycin, 1% SDS (w/v)) gefüllt. Nach Auftragung der Proteinproben wurden sie im Sammelgel bei 100 V aufkonzentriert und im Trenngel bei 140 V für 1-1,5 h aufgetrennt. Als Größenstandard wurde 1 µg des gefärbten Low-Molecular-Weight-Markers („Page Ruler™ Prestained Protein Ladder“, 10 – 170 kDa, Fermentas, St. Leon Rot) aufgetragen. Falls sich kein Western Blot (2.8.5) anschloss, erfolgte eine Anfärbung der Proteine durch 30 min Inkubation in Coomassie-Lösung (0,25 % Coomassie Brilliant Blue R250 (w/v), 40 % Methanol (v/v), 10 % Eisessig (v/v)) und Entfärbung für 1-2 h in Entfärbelösung (8 % Essigsäure (v/v) in dd H<sub>2</sub>O).

### 2.8.5 Western-Blot und Immundetektion

Ein Protein kann nach Fraktionierung im SDS-Gel durch Übertragen auf eine Nitrocellulose-Membran und Detektion mit spezifischen, markierten Antikörpern nachgewiesen werden. Diese Nachweismethode nennt man Western Blotting (Immunoblotting).

#### 2.8.5.1 Transfer-/ Blotvorgang

Der Transfer vom Gel auf die Membran kann, wie die Geltrennung, durch ein Spannungsfeld erfolgen, da die Proteine nach dem Gellauf immer noch mit SDS-Molekülen assoziiert sind. Die Membran besitzt Poren, die kleine Moleküle, wie Ionen, passieren lassen, jedoch die größeren Moleküle, wie Proteine, über hydrophobe Wechselwirkungen zurückhalten.

Der Transfer der aufgetrennten Proteine vom Trenngel auf die Nitrozellulosemembran (Bio-rad, München) erfolgte in der „Wet-blotting“-Kammer (Peqlab, Erlangen), die während des gesamten Vorgangs auf Eis gekühlt wurde. Dazu wurden die Nitrozellulosemembran und das Trenngel zwischen jeweils 2 Lagen Whatman-Papier (Whatman international Ltd, Maidstone, GB) gelegt, welche wie die Membran 1 min in 1 x Transferpuffer (25 mM Tris-HCl pH 7,5, 192 mM Glycin, 20 % Ethanol (v/v)) inkubiert wurden. Nach 60 min Transfer bei 100 V wurde die Membran zur Überprüfung des Transfers für 5 min bei RT mit Ponceau S-Lösung (0,1 % Ponceau S (w/v), 20 % Eisessig (v/v) ad dd H<sub>2</sub>O) gefärbt und durch Waschen mit dd H<sub>2</sub>O wieder entfärbt- Anschließend erfolgte die Detektion der Zielproteine mittels Immundetektion (2.8.5.2).

### 2.8.5.2 Immundetektion

Bei der Immundetektion werden spezifische Antikörper für ein nachzuweisendes Protein eingesetzt. Hierbei wird ihre Fähigkeit ausgenutzt, über ihre spezifischen Antigenbindestellen (Paratope) an spezifische Oberflächenstrukturen (Epitope) von Zielmolekülen (Antigenen) zu binden. Um die gebundenen Antikörper zu detektieren und zur Signalverstärkung (da die Erstantikörper mehrere Bindestellen für die Zweitantikörper besitzen) werden meist markierte Sekundärantikörper eingesetzt, die gegen Immunglobuline der Spezies gerichtet sind, aus der der erste Antikörper gewonnen wurde. Durch die Immundetektion im Anschluss an den Transfer der aufgetrennten Proteine auf eine Membran können sehr geringere Mengen von Proteinen nachgewiesen werden, da die Nachweisgrenze je nach Qualität des Antikörpers auf bis unter 1 pmol absinkt (Alberts, *et al* 2004).

Die Nitrozellulosemembran wird nach dem Transfervorgang (2.8.5.1) kurz in TBS/T Puffer (150 mM NaCl, 100 mM Tris-HCl pH 7,4, 0,1 %, Tween 20 (v/v)) und dann für 1 h bis ü.N. in 3 % Magermilchpulver (w/v) in TBS/T blockiert. Danach erfolgte 2 h bis ü.N. eine Inkubation mit einem Zielspezifischen Erst-Antikörper (2.8.5.3) und dann mit einem entsprechenden Sekundärantikörper (anti Maus, anti Kaninchen (2.8.5.3) je 1 zu 5000), wobei nach jeder Antikörperinkubation (Antikörper in angegebener Verdünnung (2.8.5.3) in 3 % Magermilchpulver) für 1, 5 und 10 min mit TBS/T Puffer gewaschen wurde.

Die gebundenen Antikörper wurden nun mittels Chemilumineszenz sichtbar gemacht. Dazu wurde die Nitrozellulosemembran für 1 min in einer 1:1 Mischung der Lösung A (12,5 mM Luminol (Fluka, Seelze), 396 µM Coumarsäure, 100 mM Tris-HCl pH 8,5) und B (64 µl 30% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> (Fischar, Saarbrücken), 10 mM Tris-HCl pH 8,5) des ECL- Western Blot Detektionsreagenz ohne Schwenken im Dunkeln inkubiert (bei sehr schwachen Signalen mit „enhanced chemiluminescence“ (GE Healthcare, Buckinghamshire, England) entsprechend Herstellerangaben). Die Detektion erfolgt durch Auflegen eines Autoradiographiefilms (Kodak XAR 165 1454, Sigma) für wenige Sekunden bis Minuten und anschließender Inkubation in Entwicklerlösung (Zahnfilm Entwicklerkonzentrat, Adelfo-Chemie GmbH, Dietzenbach) bis Bandensignale gut sichtbar waren, gefolgt von Waschen in Wasser, Inkubation in Fixierlösung (Zahnfilm Fixiererkonzentrat, Adelfo-Chemie GmbH, Dietzenbach) für mindestens 1 min und abschließendem Waschen und Trocknen des Films.

Die Detektionsmethode beruhte dabei auf einer Reaktion mit der Peroxidase der sekundären Antikörper. Bei der Chemilumineszenz mit dem ECL- Western Blot Detektionsreagenz wird Luminol durch die Peroxidase oxidiert, geht in einen angeregten Zustand über und emittiert Licht bei Rückkehr in den Grundzustand.

### **2.8.5.3 Verwendete Antikörper**

Zur Detektion der Zielproteine wurden folgende Antikörper eingesetzt: anti-Flag-HRP (1:1000, monoklonal Maus) und anti-Tubulin (1:5000, monoklonal Maus), anti-Aktin (1:5000, polyklonal, Kaninchen; alle drei von Sigma-Aldrich) anti-SIRT3 (Imgenex, San Diego, CA), anti-c-Myc (1:2000, monoklonal Maus, hergestellt von Frau Natalie Fadle, Jose Carreras Zentrum, Homburg), anti-H4 (1:5000, monoklonal Maus, ü.N. 4°C; ab31827; Abcam, Cambridge) and anti-Acetyl-H4-Lys16 (1:2000, polyklonal, Kaninchen; Upstate Biotechnology, Hamburg), anti-Kaninchen-HRP (1:5000, Ziege; Dianova, Hamburg), anti-Maus (1:5000, Ziege; Dianova, Hamburg).

### **2.8.6 Immunpräzipitation**

SIRT3 Wildtyp und die SNP Mutanten mit Flag Markierung wurden aus  $2 \times 10^6$  transfizierten Zellen aufgereinigt, indem nach Proteinisolierung (2.8.1) die Flag markierten Proteine aus dem Gesamtproteinlysat mit 40 µl anti-Flag M2 Affinitäts-Gelkügelchen gemischt und ü.N. auf einem Überkopfschüttler bei 4°C inkubiert wurden. Die Ansätze wurden bei 5000 g und 4°C für 10 min zentrifugiert und dreimal mit Proteinlysepuffer (2.8.1) und zweimal mit Deacetylierungspuffer (50 mM Tris/HCl pH 9; 4 mM MgCl<sub>2</sub>; 50 mM NaCl; 0,5 mM DTT) gewaschen und im (Histon) SIRT3-Deacetylierungsassay (2.8.7) eingesetzt.

### **2.8.7 SIRT3 Deacetylierungs-Aktivitätstest**

Zur Bestimmung der Aktivität von SIRT3 und eventuellen Aktivitätsunterschieden bei den SIRT3 SNP Mutanten (2.2.1) wurden gleiche Mengen von aufgereinigten SIRT3-Flag-Konstrukten (SIRT3 WT, R80W und V208I) mit Deacetylierungsassay (vgl. 2.8.6) mit gleichen Mengen (10 µg) eines Ansatzes aufgereinigter, hyperacetylierter Histone (2.8.2) für die gleiche Zeit (15 bis 30 min) bei 30°C in Gegenwart von 5 mM NAD und 0,5 µM TSA (Inaktivierung eventuell vorhandener Reste von Klasse I und II HDACs) und sowohl mit, als auch ohne 5 mM NAM (Nikotinamid, zur Inaktivierung von SIRT3) inkubiert und anschließend nach Hitzeinaktivierung bei 90°C für 5 min und SDS Probenpufferzugabe (vgl. 2.8.4) mittels Western Blot (2.8.5) analysiert.

Bei der Immundetektion (2.8.5.2) mit entsprechenden Antikörpern (2.8.5.3) wurde zum einen der Einsatz gleicher Mengen an SIRT3 (anti-Flag und anti-SIRT3) und Histonen (H4gesamt) kontrolliert und zum anderen mittels Antikörper gegen acetyliertes H4Lys16 die Aktivität von

SIRT3 über den Acetylierungsgrad von H4Lys16 bestimmt (je weniger Signal, desto mehr Deacetylierung, desto aktiver SIRT3).

### **2.8.8 Protein- / SIRT3 Stabilitätstest**

24 h nach transienter Transfektion (SIRT3 WT und SIRT3<sub>R80W</sub> oder SIRT3<sub>V208I</sub>) von HeLa Zellen erfolgte eine Inkubation mit Zykloheximid (40 µg/µl DMSO, 40 µg/ml Medium) zur Inhibition der Proteinsynthese für bis zu 48 h. Zur Kontrolle wurden die Zellen für die gleiche Zeit mit der gleichen Menge an DMSO (1 µl) inkubiert, um einen Effekt durch das Lösungsmittel DMSO alleine ausschließen zu können. Zu verschiedenen Zeitpunkten (3.3.3) wurden Proben zur Proteinisolierung entnommen und mittels Western Blot (2.8.5) analysiert.

### **2.8.9 Immunfluoreszenz-Mikroskopie**

Die Detektion von transfizierten Zellen, die GFP-Konstrukte (2.2.1) exprimierten (zur Kontrolle der Transfektionseffizienz), erfolgte 20 – 48 h nach Transfektion (2.4.3) am einem Fluoreszenzmikroskop (Leica DM IL, Leica Vertrieb GmbH, Bensheim) bei Vergrößerungen von 40 bis 400 fach bei entsprechender Anregung des GFP-Fusionsteils (Anregung: 489 nm, Emission: 508 nm).

## **2.9 Statistische Auswertungen**

Die statistischen Auswertungen der Korrelationsanalysen der SNP und Genexpressionsdaten mit den Patientendaten wurden von den Statistikern Herrn M. Kramer der Universität Dresden und Frau Dr. Ong des Instituts für medizinische Biometrie der Universität des Saarlandes durchgeführt.

Bei den statistischen Auswertungen der SNP Analysen (3.2, (Mahlknecht, *et al* 2009)) wurden Unterschiede von Labor- und klinischer Parameter zwischen SNPs verglichen, indem der Mann-Whitney-U-Test („U-Test“ „Wilcoxon-Rangsummentest“) für kontinuierliche Variablen und der  $\chi^2$ -Test für kategoriale Variablen. Das Gesamtüberleben (OS, overall survival) ergab sich vom Zeitpunkt der Diagnose bis zum Tod (oder in manchen Fällen, bis zur letzten Folgeerfassung (last follow up)). Das krankheitsfreie Überleben wurde ermittelt aus der Zeit der kompletten Remission (CR) bis zum Rückfall (Rezidiv), zum Tod oder bis zur letzten Folgeerfassung (last follow up)). Die Kaplan-Meier Methode wurde genutzt, um die Überlebenswahrscheinlichkeiten abzuschätzen, welche durch Nutzung des Log Rank Tests zwischen

den Gruppen verglichen wurden. Das Cox Modell wurde zur Identifizierung unabhängiger prognostischer Variablen für Überleben angewendet. Das Signifikanzlevel betrug 0,05. Um eine quantitative Information über die Relevanz der Ergebnisse zu geben, wurden 95 % Konfidenzintervalle (CIs) von „Odd Ratios“ (Verhältnis des Quotienten aus Wahrscheinlichkeit und Gegenwahrscheinlichkeit) und „Hazard Ratios“ (Verhältnis zwischen Wahrscheinlichkeit, dass ein Ereignis stattfindet oder nicht stattfindet) ermittelt.

Mittels Multivarianz-Cox Analyse (multivariate Statistik) wurden mehrere statistische Variablen, wie verschiedene SNPs und klinischer Parameter, gleichzeitig untersucht, um eventuelle Abhängigkeitsstrukturen der Parameter aufzudecken oder einen einzelnen Parameter als unabhängigen Faktor zu identifizieren.

Die statistischen Analysen wurden mit der Software SPSS 12.0.1 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) und des S-PLUS Programms (Insightful AG, Reinach, Schweiz) durchgeführt. Eine Abweichung vom Hardy Weinberg Gleichgewicht für die drei relevanten SNPs (CDA SNP A79C, SNP A-92G und SNP C-451T) mit signifikanten Patientenzahlen in allen drei Genotypen wurde mit dem  $w^2$ -Test kontrolliert. Weiterhin wurde neben dem Kopplungsungleichgewicht („linkage disequilibrium“,  $D$ ) zwischen den genetischen Markern (paarweise) auch das normalisierte Kopplungsungleichgewicht ( $D' = D / D_{\max}$  oder  $D_{\min}$ , mit  $D_{\max}$  = maximal mögliches und  $D_{\min}$  = minimal mögliches  $D$ ) berechnet (Lewontin 1964), wobei ein Wert von  $D'$  nahe 0 für Unabhängigkeit und nahe 1 für Abhängigkeit der verglichenen Loci bedeutet.

Für die statistischen Analysen der Genexpressions- und Korrelationsanalysen der Genexpressionsdaten mit den AML-Subtypen (FAB Klassifikation) und Patienten- bzw. klinischen Daten (Geschlecht, Alter, Zytogenetik, CD34, Leukozyten, Knochenmark Blasten, Karyotyp, komplette Remission (CR), Zeit bis CR, Rezidivbildung, Nebenwirkungen wie Antithrombin (AT III), Blutungen, Bilirubin, Glutamat-Oxalacetat-Transaminase/Glutamat-Pyruvat-Transaminase (zur Erkennung von Leber- und Gallenerkrankungen), Alkalische Phosphatase (AP, Hinweise auf vorliegende Krankheiten der Leber und des Skeletts), Übelkeit, Stomatitis (Entzündung der Mundschleimhaut, Kreatinin (Nierenfunktion), Proteinurie (Eiweißausscheidung), Hematurie (Blut im Urin), Herzfunktion, Perikarditis (Herzbeutelentzündung), peripheres und zentrales Nervensystem und Obstipation (Verstopfung)) wurde ebenfalls die Software SPSS (s.o. Version 1.7) genutzt.

Die statistischen Analysen der Genexpressionsveränderungen zwischen gesunden Probanden und AML Patienten erfolgte mittels Mann-Whitney-U-Test. Auch die Korrelationsanalysen

wurden mittels Mann-Whitney-U-Test zur Überprüfung der Signifikanz von Übereinstimmungen verwendet, aufgrund Berücksichtigung der z.T. geringen Probenanzahl in den Subgruppen. Es wurden dabei exakte Signifikanzen (zweiseitig) für nicht-parametrische Ergebnisse ermittelt, wobei p Werte unter 0,05 als signifikant (ein Stern) und Werte unter 0,01 als hoch signifikant (zwei Sterne) angesehen wurden.

Mittels Multivarianzanalyse wurden mögliche Einflussfaktoren wie Knochenmark Blastengehalt, Alter, Zytogenetik u.a. Parameter mit den Korrelationen zwischen HDAC Expression und AML-Subtypen analysiert.

## **2.10 Datenbanken, *in silico* Analysen - und Computerprogramme**

### **2.10.1 SNP-Datenbanken**

Die beiden wichtigsten Hauptdatenbanken für SNPs stellen die HapMap (Int.-HapMap-Consortium 2003) und die dbSNP Datenbank (Sherry, *et al* 2001) dar, wobei erstere nur validierte, d.h. bestätigte SNPs beinhaltet und dabei Ergebnisse aus 270 Proben aus vier verschiedenen Populationen (90 Personen aus Afrika (Nigeria), 90 aus Nord und West Europa (Kaukasier), 45 aus China und 45 aus Japan) anzeigt. In der dbSNP Datenbank werden validierte und nicht validierte SNPs gelistet. Die SNP Datenbank der Firma Applied Biosystems (De La Vega, *et al* 2002) stellt eine weitere SNP Datenbank dar.

### **2.10.2 *In silico* Analysen**

Die beschriebenen SNP Datenbanken (2.10.1) wurden zur Identifizierung von SNP Kandidaten für ausgewählte Gene durchsucht (*in silico* Analyse), wobei sich die Suche auf Promotor SNPs und kodierende, nicht synonyme SNPs, d.h. die zu Veränderungen auf Aminosäureebene führen, konzentrierte.

### **2.10.3 Computerprogramme**

Die Texte, Tabellen und Abbildungen dieser Arbeit wurden mit Microsoft *Office 2000* erstellt.

Die Analyse von Promotorsequenzen nach putativen Transkriptionsfaktoren erfolgte mittels dem Programm TF Search ([www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html](http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCH.html)) (mit einem Grenzwert von 90 % minimaler Übereinstimmung der Sequenz).

Restriktionsschnittstellen in DNA-Sequenzen wurden mit dem Programm *Vector NTI Version 5.2.9* (InforMax Inc., Bethesda) oder *GeneRunner 3.05* (Hastings Software Inc., New York, USA) gesucht.

DNA-Sequenzierungen wurden mit dem Programm *Chromas 1.45* der Firma Technelysium (Helensvale, Australien) und anschließend mit dem *Biocomputing Service* "HUSAR Bioinformatic labs" des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ), Heidelberg ausgewertet. Ebenso wurden Sequenzvergleiche mit ClustalW über den *Biocomputing Service* "HUSAR Bioinformatic labs" des Deutschen Krebsforschungszentrums (DKFZ), Heidelberg und dem online Programm von NCBI („Align two sequences“) durchgeführt.

SIRT3 SNPs wurden mit Hilfe des online Rechners von Michael H. Court (tuft.edu/~mcourt01) auf Übereinstimmung mit dem Hardy Weinberg Gleichgewicht analysiert.

Für Literaturrecherchen und die Suche nach Nukleotidsequenzen wurde die MEDLINE-Datenbank (National Library of Medicine) benutzt.

### 3 Ergebnisse

#### 3.1 AML-Subtypspezifische Genexpressionsanalysen von HDACs

Im Kontext des Einsatzes von HDAC Inhibitoren in der AML Therapie wurde die Veränderung der HDAC Expressionsstärke im Vergleich zu gesunden Probanden und speziell auch im Vergleich der einzelnen AML-Subtypen untereinander auf Unterschiede und subtypspezifische Charakteristika analysiert, da Unterschiede im Expressionslevel Auswirkungen auf den spezifischeren Einsatz bestimmter HDAC Inhibitoren und das Therapieansprechen, sowie eine angepasste HDACi Dosis haben könnten.

Die AML-Subtypspezifischen HDAC Expressionsanalysen wurden in 55 AML Patienten (Tabelle 11) durchgeführt, welche Proben aller häufig auftretendem AML-Subtypen (M0, M1, M2, M4, M4/E0, M5a, M5b) und unterschiedliche, besonders häufige zytogenetische Aberrationen (inv16, t(8,21), Mono 7/del(7q) und Standardrisiko) beinhalten.

**Tabelle 11: AML Patientendaten der Genexpressionsanalysen (55 AML Patienten).**

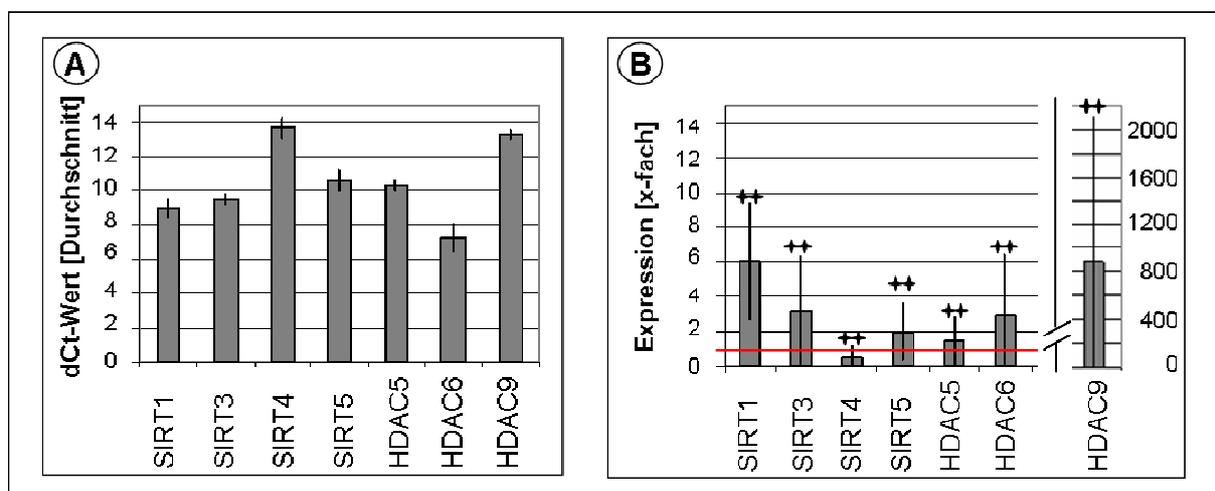
	Anzahl	Prozent [%]
<b>Gesamt</b>	55	100
<b>Geschlecht</b>		
Männlich	38	69,1
Weiblich	17	30,9
<b>AML-Subtypen (FAB)</b>		
M0	2	3,6
M1	11	20,0
M2	14	25,5
M4	6	10,9
M4/E0	11	20,0
M5a	8	14,5
M5b	2	3,6
RAEB	1	1,8
<b>Zytogenetik</b>		
Inv(16)	10	18,2
t(8;21)	7	12,7
Mono 7/del(7q)	19	34,5
Standardrisiko	19	34,5

AML M3 (APL) war in der Studie (AML96, 2.6) nicht enthalten, da dieser Subtyp aufgrund seiner charakteristischen Aberrationen durch spezielle Behandlung (Vitamin A Analog) eine außergewöhnlich gute Prognose mit 70-80% Überlebensrate aufweist (1.4.1).

### 3.1.1 HDAC Genexpressionsveränderungen in AML

Die Genexpressionsanalysen konzentrierten sich auf SIRT1, 3, 4, 5 und HDAC5, 6 und 9, da diese in vorherigen Analysen von Bradbury et al. 2005 und in unveröffentlichten cDNA-Chip Analysen Veränderungen (von mehr als 2-fach stärkerer oder um mehr als 0,5-fach erniedrigter Expression) in AML Proben gezeigt hatten. Da die anderen HDACs in diesen Studien keine (signifikanten) Expressionsunterschiede zeigten, wurden sie aus den Analysen rausgelassen.

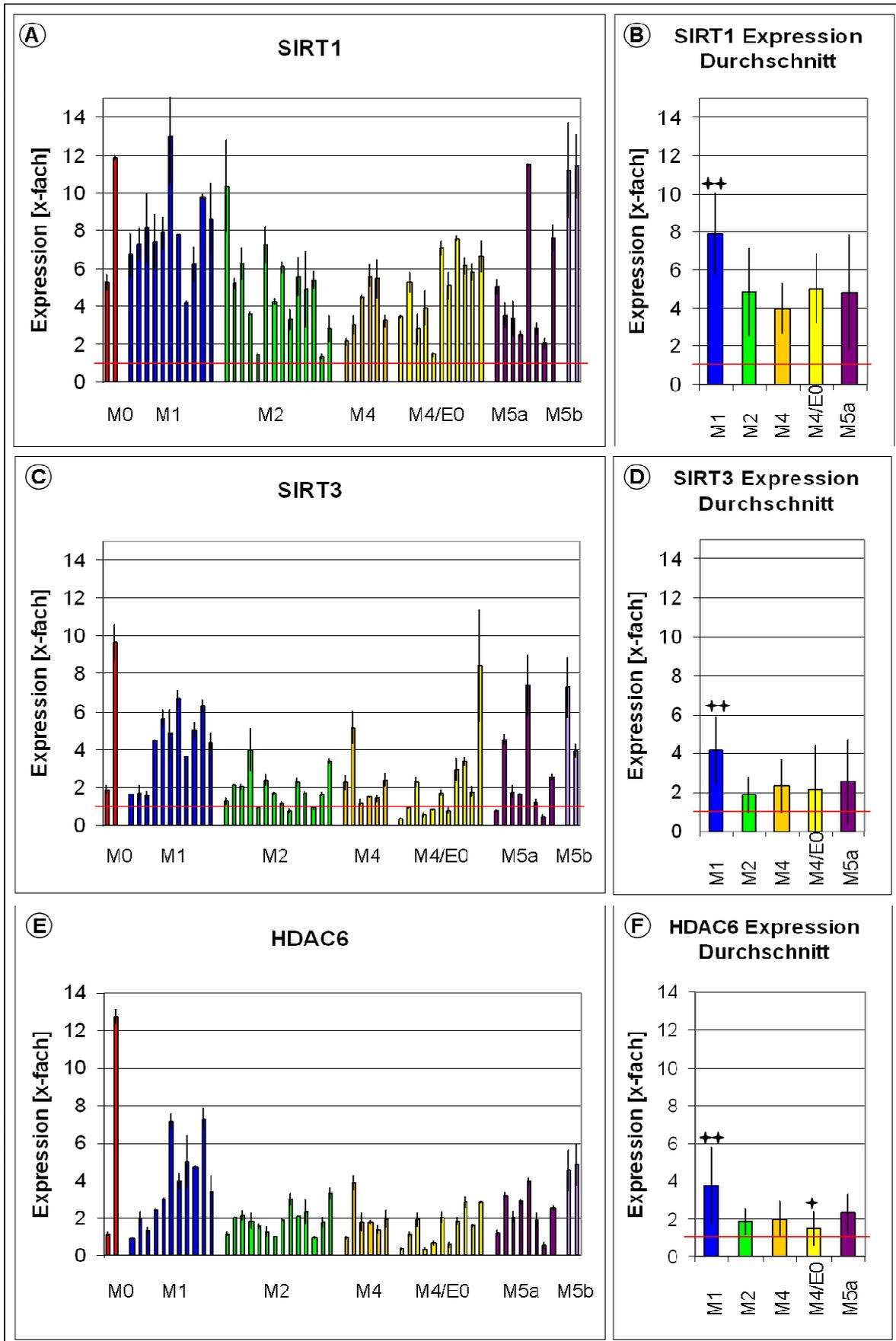
Als erstes wurden die HDAC Expressionen der AML Proben mit dem Mittelwert der entsprechenden Expressionen von 12 gesunden Probanden verglichen (Abbildung 12).



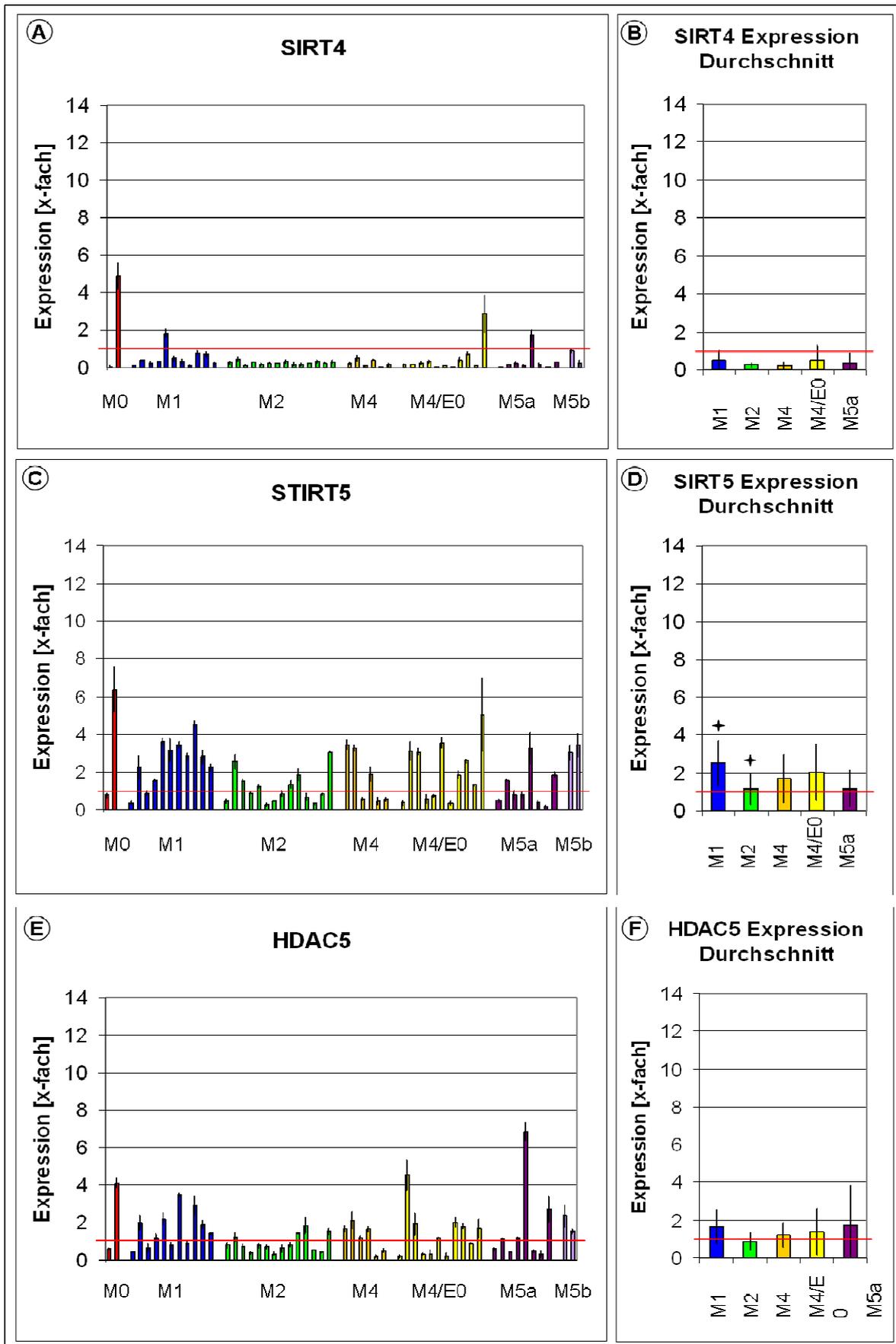
**Abbildung 12: Durchschnittliche HDAC Expressionsveränderungen von AML Proben (B) im Vergleich zu den durchschnittlichen Expressionen von Proben gesunder Probanden (A).**

(Signifikanzen zeigen Signifikanz der Expressionsveränderungen gegenüber gesunden Probanden an)

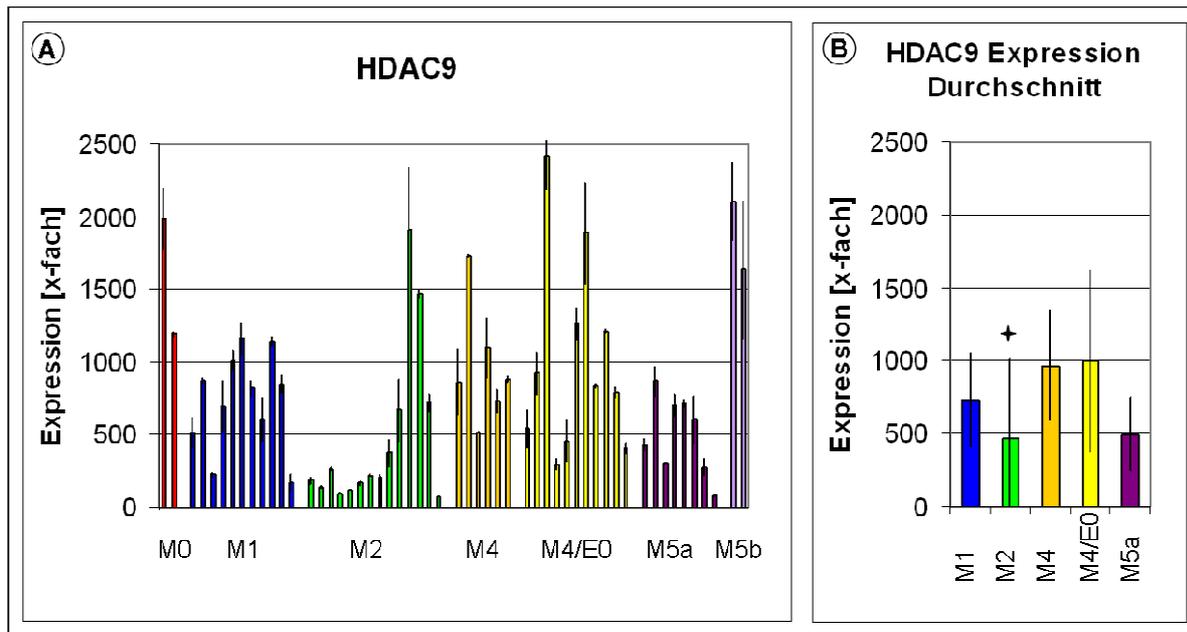
Im Gegensatz zu sehr homogenen HDAC Expressionsleveln in der Kontrollgruppe, den gesunden Probanden (Abbildung 12 A), zeigten sich sehr variierende Expressionsveränderungen bei den AML Proben (Abbildung 12 B). Trotz der stärker variierenden Expressionensleveln der einzelnen HDACs konnten eindeutige, allesamt hoch signifikante (alle  $p < 0,001$ ) Tendenzen der Expressionsveränderungen festgestellt werden. SIRT1, SIRT3, HDAC6 und HDAC9 zeigten in allen (SIRT1, HDAC9) oder fast allen (SIRT3, HDAC6) AML Proben erhöhte Expression (Abbildung 12 B, Abbildung 13 A, B, C, D, E, F, Abbildung 15), während SIRT4 in fast allen AML Proben eine deutlich reduzierte Expression zeigte (Abbildung 12 B, Abbildung 14 A, B).



**Abbildung 13: Gesteigerte Expressionslevel bei SIRT1, 3 und HDAC6 in den meisten AML Proben.** In A), C), E) sind die Expressionen der einzelnen Proben und in B), D), F) die Durchschnittswerte der einzelnen Subtypen mit Signifikanzen der suptypspezifischen Expressionsleveln dargestellt.



**Abbildung 14: Verringerte Expressionslevel bei SIRT4 und verringerte als auch gesteigerte Expressionslevel bei SIRT5 und HDAC5 in den AML Proben.**  
(Darstellung A) - F) wie in (Abbildung 13).



**Abbildung 15: Starke Expressionssteigerung von HDAC9 in den AML Proben.**

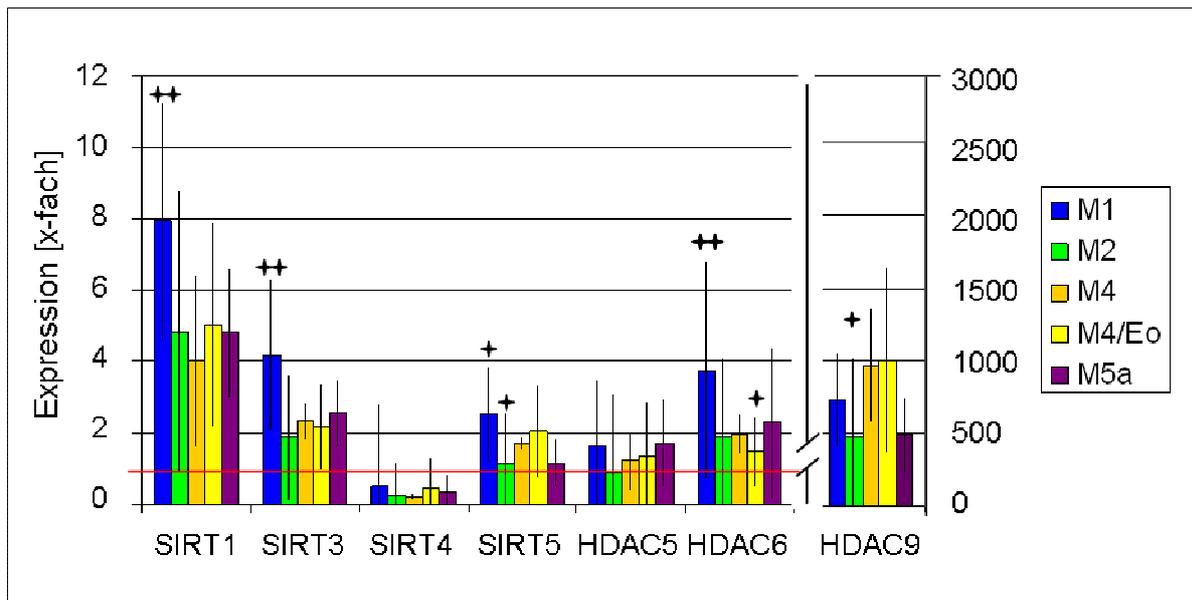
SIRT5 und HDAC5 zeigten sowohl erhöhte, als auch reduzierte Expression, was sich in den hohen Standardabweichungen der Durchschnittswerte widerspiegelt. (Abbildung 12 B, Abbildung 14 C, D, E, F). Die maximale Expressionssteigerung der analysierten Gene lag bei SIRT1 bei 12-fach und war bei allen anderen HDACs etwas geringer, wobei HDAC9 hierbei aus dem Rahmen fällt und maximale Expressionssteigerungen von mehreren hundert bis maximal etwas über 2000-fach aufzeigte (Abbildung 12 B, Abbildung 15).

### 3.1.2 HDACs zeigen AML-Subtypspezifische Expressionsmuster

Das Hauptziel der Expressionsanalysen bestand in der Aufklärung der Frage, ob es AML-Subtypspezifische Genexpressionsunterschiede gibt, welche großen Einfluss auf HDAC Inhibitorbehandlung der entsprechenden Subtypen haben könnten.

Trotz der hohen Variabilität in der Stärke der Expressionsveränderungen sogar innerhalb der Subgruppen, konnte AML M1 als Subtyp mit höheren Expressionssteigerungen aller HDACs (bis auf HDAC9 und nur gering bei HDAC5) im Vergleich zu allen anderen Subtypen charakterisiert werden, wobei die Werte für SIRT1, SIRT3, SIRT5 und HDAC6 z.T. hoch signifikant waren mit p Werten von  $< 0,001$ ;  $0,005$ ;  $0,019$  und  $0,003$ , wohingegen die Unterschiede für SIRT4 und HDAC5 nicht signifikant waren ( $p = 0,054$  und  $0,08$ ) (Abbildung 13, Abbildung 14, Abbildung 15, Abbildung 16 und Anhang Tabelle 19).

Die Subtypen M0 und M5b wurden aus der subtypspezifischen Analyse aufgrund der geringen Probenanzahl (bedingt durch ihr seltenes Auftreten ([www.cancer.org](http://www.cancer.org))) herausgelassen.



**Abbildung 16: AML-Subtypspezifische durchschnittliche HDAC Expressionslevel mit Signifikanzen.**

Die Signifikanzen beziehen sich auf die jeweilige Genexpressionsveränderung eines Gens eines Subtyps in Bezug auf die Genexpressionsveränderungen des gleichen Gens aller anderen Subtypen als Gruppe zusammengefasst; d.h. eine signifikante Veränderung zeigt an, dass die Genexpressionsveränderung eines Subtyps sich bei diesem Gen signifikant von der durchschnittlichen Genexpression aller anderen Subtypen unterscheidet. Dabei ist für die Signifikanz auch die unterschiedliche Probenanzahl bei den Subtypen berücksichtigt worden.

Um zu analysieren, ob mögliche Unterschiede im Blastengehalt (CD34+) der AML-Subtypen die Ergebnisse der AML-Subtypischen Genexpressionsanalysen beeinflussen könnten, führten wir auch Korrelationsanalysen der HDAC Expressionsveränderungen mit dem CD34+ Anteil durch (Abbildung 18), wobei zuerst analysiert wurde, ob es Unterschiede in der Verteilung der CD34+ Zellen gibt (Abbildung 17).

Der durchschnittliche Blastengehalt zeigte tatsächlich deutliche, jedoch auch sehr uneinheitliche Unterschiede zwischen den einzelnen AML-Subtypen (Abbildung 17). So lag der Blastengehalt bei AML M1 und M4 in fast allen Fällen bei über 50 % und Fälle zwischen 21-50 % traten gar nicht auf, wohingegen bei M2 und M4/E0 auch mehrere Fälle mit Blastengehalt in diesem Bereich zwischen 21-50 % auftraten. Bei AML M5a zeigte sich ein ganz anderes Verhältnis, da keine Fälle mit einem Blastengehalt von über 50 % vorkamen und die meisten Fälle sogar unter 20 % auftraten. Im Gegensatz zu den Korrelationen der HDAC Expression mit AML-Subtypen, bei denen nur der Subtyp M1 deutlich höhere Expressionslevel aufzeigte und die anderen Subtypen sehr ähnliche Werte aufwiesen (auch M5a) (Abbildung 16), ergaben sich also bei der Verteilung des Blastengehalts deutliche Unterschiede zwischen allen Subtypen.

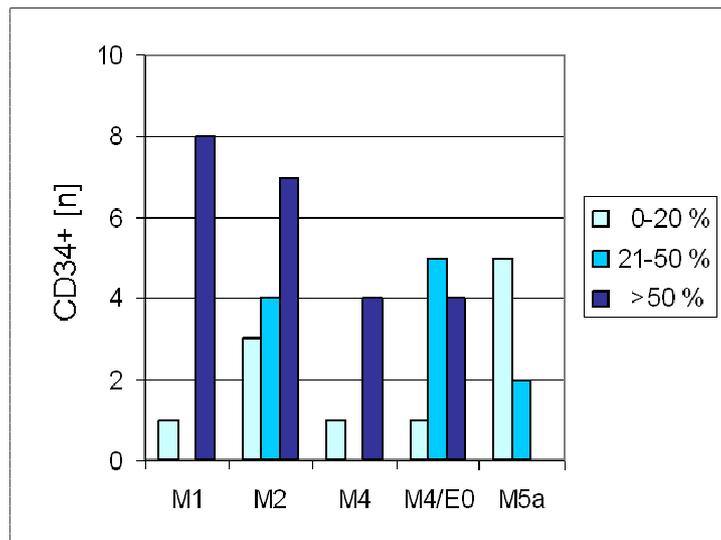


Abbildung 17: Verteilung CD34+ Zellen in den AML-Subtypen.

Die Korrelation der HDAC Expression mit CD34+ Zellkonzentration (Abbildung 18) offenbarte keine erkennbaren Tendenzen oder Korrelationen mit höherer oder niedriger CD34+ Konzentration, wobei bei SIRT1 und HDAC9 keine Unterschiede und bei SIRT3, -5, und HDAC5 und -6 gegensätzliche Tendenzen zu erkennen waren, indem die Expressionswerte ober- und unterhalb der mittleren CD34+ Zellkonzentration gegenüber dieser jeweils gleichstark erhöht waren, was wiederum keinen Hinweis auf mögliche Beeinflussung der Korrelationen der HDAC Expressionen mit den Subtypen lieferte.

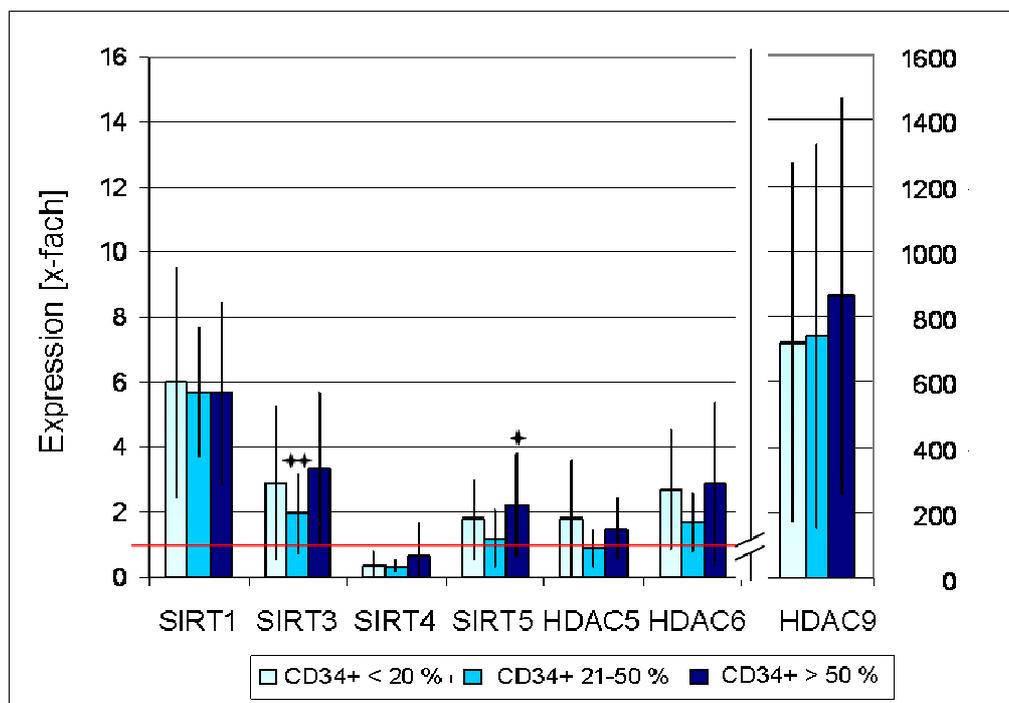


Abbildung 18: Korrelation HDAC Expression und Blastengehalt (CD34+). (Signifikanzen entsprechend (Abbildung 16))

Die statistische Analyse der Korrelation zwischen HDAC Expression und CD34+ Zellkonzentration bestätigte diese Ergebnisse und zeigte ohne Gruppeneinteilung der CD34+ Zellen gar keine Signifikanz und nach Einteilung der CD34+ Zellkonzentration in Gruppen von <20 %, 21-50 %, >50 % nur eine statistisch relevante Korrelation bei SIRT3 ( $p = 0,031$ ) und bei SIRT5 ( $p = 0,046$ ), aus denen jedoch aufgrund der beschriebenen gegensätzlichen Tendenz keine Beeinflussung der Ergebnisse der HDAC Expressionsveränderungen mit den AML-Subtypen abgeleitet werden kann.

Eine abschließende Multivarianzanalyse der HDAC Expression und AML-Subtypen mit CD34+ Gehalt (in Gruppen eingeteilt) zeigte entsprechend, dass die Korrelation der höheren HDAC Expressionswerte des AML-Subtyps M1 signifikant bis hochsignifikant blieb mit  $p$  Werten von 0,023 bis  $< 0,001$  (SIRT1:  $p < 0,001$ ; SIRT3:  $p = 0,006$ ; SIRT5:  $p = 0,023$ ; HDAC6:  $p < 0,001$ ).

### 3.1.3 Korrelationsanalysen der HDAC Expressionen mit zytogenetischen Aberrationen und Karyotyp

Im Rahmen der Kontrollanalysen zu den AML-Subtypspezifischen Analysen wurden auch Korrelationsanalysen zwischen HDAC Expression und AML Gruppen mit häufigen zytogenetischen Aberrationen, wie Inversion (16), t(8;21), Monosomie 7/del(7q) und mit Standardrisiko durchgeführt (Abbildung 19, Anhang: Abbildung 43, Tabelle 20).

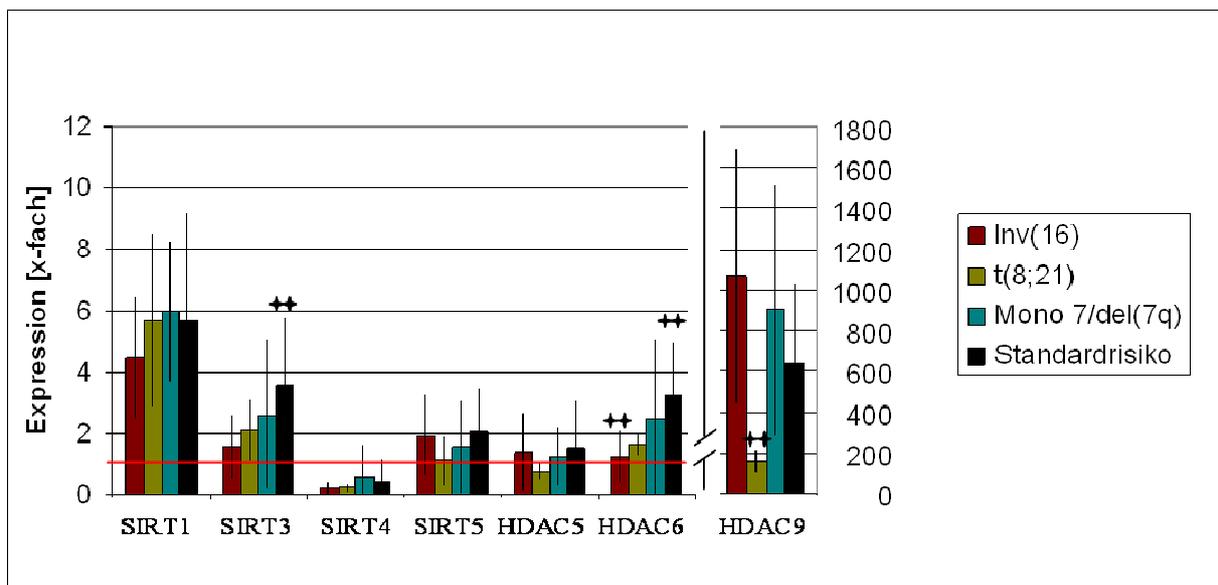


Abbildung 19: Korrelation der durchschnittlichen HDAC Expressionen mit AML Gruppen mit bestimmten zytogenetischen Aberrationen.

(Signifikanzen entsprechend (Abbildung 16))

Dabei zeigte sich, dass AML mit t(8;21) bei HDAC9 hochsignifikant ( $p < 0,001$ ) geringere Expressionssteigerung im Vergleich zu AML mit Inversion(16), Monosomie 7/del(7q) und AML mit Standardrisiko aufwies (siehe auch Anhang: Abbildung 45), was auch nach Multivarianzanalysen mit CD34+ noch signifikant war mit  $p = 0,002$ .

Weiterhin konnte bei SIRT3 und HDAC6 ein signifikant ( $p = 0,009$  und  $0,001$ ) stärkerer Anstieg der Expression bei der AML Gruppe mit Standardrisiko gegenüber den anderen zytogenetischen Aberrationen festgestellt werden. HDAC6 zeigte außerdem bei Inversion(16) eine signifikant ( $p = 0,002$ ) geringere Expression im Vergleich zu den anderen Gruppen (siehe auch Anhang: Abbildung 44). Die Signifikanzen dieser Korrelationen waren nach Multivarianzanalyse mit CD34+ Gehalt sogar noch höher mit p Werten von  $0,002$  und  $0,008$  für SIRT3 und HDAC6 bei Vergleich der Expressionslevel bei Standardrisiko mit den anderen Gruppen und  $0,029$  für HDAC6 bei Inversion(16) im Vergleich zu den anderen Gruppen.

Weiterhin wurde auch die Korrelation von HDAC Expression und normalem gegenüber aberrantem Karyotyp analysiert und gezeigt, dass SIRT3 und HDAC6 auch hier entsprechende signifikante Korrelationen der gesteigerten Expression (3,5 zu 2,6 fach und 3,55 zu 2,2 fach mit p-Werten von  $0,042$  und  $0,002$ ) in AML Proben mit normalen Karyotyp zeigten (Abbildung 20).

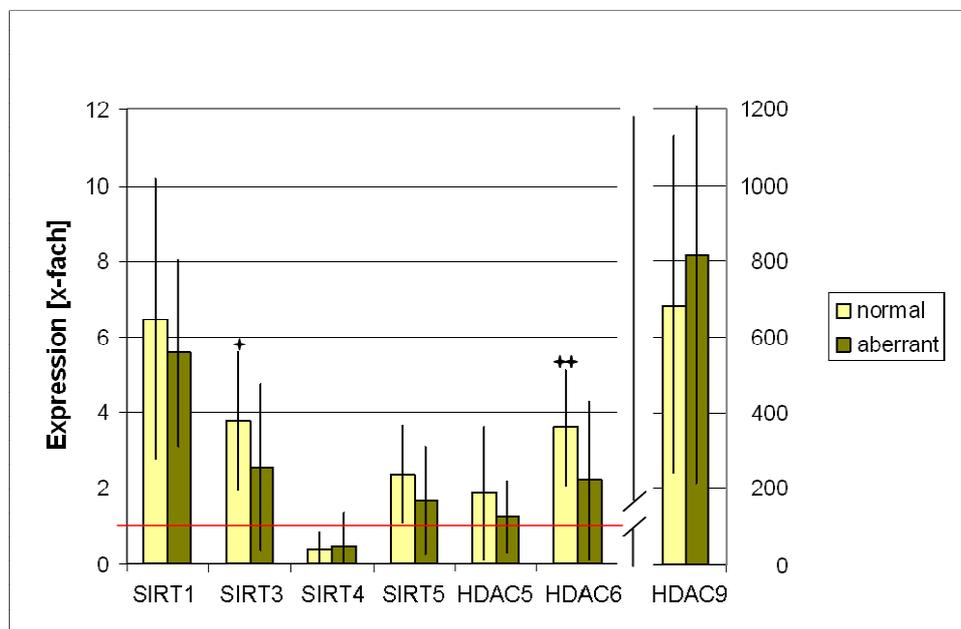


Abbildung 20: Korrelation der durchschnittlichen HDAC Expressionen mit AML mit normalen und aberrantem Karyotyp.

### 3.1.4 Analyse des Einflusses der Korrelationen von HDAC Expressionsleveln mit zytogenetischen Aberrationen und deren Verteilung in AML-Subtypen auf die Signifikanz der AML-Subtypspezifischen HDAC Expressionsleveln

Aufgrund der Korrelationen der HDAC Expressionslevel mit einzelnen zytogenetischen Aberrationen (und da bekannt ist, dass bestimmte zytogenetische Aberrationen hauptsächlich in bestimmten AML-Subtypen vorkommen,) wurde die Verteilung der zytogenetischen Aberrationen in den hier analysierten Proben der einzelnen Subtypen untersucht (Tabelle 12) und eine Multivarianzanalyse mit HDAC Expressionslevel, AML-Subtypen und AML Zytogenetik durchgeführt, um herauszufinden, ob die Korrelation zwischen HDAC Expressionsleveln und einzelnen Aberrationen aufgrund von Korrelationen der Aberrationen mit AML-Subtypen einen Einfluss auf die Korrelation zwischen AML-Subtypen und HDAC Expressionsleveln hat.

**Tabelle 12: Verteilung der zytogenetischen Aberrationen unter den AML-Subtypen. (n = Anzahl)**

Zytogenetische Abberation	t(8;21)	Inv(16)	Mono7/del(7q)	Standard-risiko
AML-Subtyp	% (n)	% (n)	% (n)	% (n)
M0 (2)			100% (2)	
M1 (11)	-	-	45% (5)	55% (6)
M2 (14)	43% (6)	-	43% (6)	14% (2)
M4 (6)	-	17% (1)	50% (3)	33% (2)
M4/E0 (11)	-	82% (9)	9% (1)	9% (1)
M5a (8)	-	-	12,5% (1)	87,5% (7)
M5b (2)	-	-	50% (1)	50% (1)
RAEB (1)	100% (1)	-	-	-

Die Betrachtung der Verteilung der zytogenetischen Aberrationen unter den AML Subgruppen (Tabelle 12) zeigte, dass die bekannten Verteilungen wie z.B. t(8;21) bei AML M2 und Inversion(16) bei AML M4 / M4/E0 (Haferlach, *et al* 2004) auch bei den hier eingesetzten Proben zutrifft. Ein Vergleich der Verteilung der zytogenetischen Aberrationen in den AML-Subtypen und den Korrelationen zwischen den HDAC Expressionsleveln und den AML-Subtypen verdeutlichte, dass die Korrelation der HDAC Expressionen mit AML-Subtypen auch nicht durch die Korrelation der HDAC Expression mit zytogenetischen Aberrationen hervorgerufen wurde, was besonders am Bsp. von AML M1 und M5a deutlich wurde, da der Anteil der Gruppe mit Standardrisiko, welche meist die höchsten HDAC Expressionen aufzeigten (Abbildung 19), bei AML M5a mit 87% noch höher war, als bei AML M1 mit 55% (weiterhin treten bei beiden Subtypen ansonsten nur Inversion(16) Aberrationen auf), wohingegen die Korrelation der HDAC Expression mit den Subtypen hochsignifikant stärkere Ex-

pressionserhöhung für AML M1 gegenüber allen anderen Subtypen, inklusive AML M5a, zeigte. Wäre die Korrelation von Standardrisiko und HDAC Expression für die erhöhten Expressionen bei AML M1 verantwortlich, dann hätte AML M5a aufgrund des deutlich größeren Anteils an Proben mit Standardrisiko die höchsten Expressionssteigerungen zeigen müssen.

Die Multivarianzanalyse bestätigte ebenfalls, dass die Signifikanz von AML M1 als Subtyp mit stärkerer Erhöhung der HDAC Expressionen trotz Korrelation der HDAC Expression und AML-Subtypen mit zytogenetischen Aberrationen erhalten bleibt (mit p Werten von SIRT1 = 0,006; SIRT3 = 0,02; SIRT4 = 0,005 und HDAC6 = 0,012).

### **3.1.5 Korrelationsanalyse HDAC Expression mit Leukozyten Konzentration und klinischen Parametern**

Die Korrelationsanalyse der HDAC Expression mit Leukozytenkonzentration als auch mit klinischen Parametern bzw. unerwünschten Nebenwirkungen wie Antithrombin (AT III), Blutungen, Bilirubin, Glutamat-Oxalacetat-Transaminase/Glutamat-Pyruvat-Transaminase (GOT/ GPT, zur Erkennung von Leber- und Gallenerkrankungen), Alkalische Phosphatase (AP, Hinweise auf vorliegende Krankheiten der Leber und des Skeletts), Übelkeit, Stomatitis (Entzündung der Mundschleimhaut, Kreatinin (Nierenfunktion), Proteinurie (Eiweißausscheidung), Hämaturie (Blut im Urin), Herzfunktion, Perikarditis (Herzbeutelentzündung), Peripheres und zentrales Nervensystem und Obstipation (Verstopfung), ergab bis auf zwei Ausnahmen keine erkennbaren Korrelationen. So war eine geringere Steigerung der Expression von SIRT1 signifikant korreliert mit gesteigerter Konzentrationen von Antithrombin (ATIII) (nach Spearman Rho:  $p = 0,016$ ). Zum anderen war Auftreten von Proteinurie bzw. eine stärkere Ausprägung (WHO Grad 1 und 2 statt 0) von Proteinurie korreliert mit gesteigerter Expression von HDAC6 ( $p = 0,037$  bei Korrelationsanalyse nach Spearman Rho).

### **3.1.6 Korrelationsanalysen zwischen HDAC Expressionsleveln, klinischem Ansprechen und Überleben**

Da Korrelationen zwischen HDAC Expressionsleveln und klinischem Ansprechen, Prognose und Überleben für manche HDACs bei manchen Tumoren bekannt ist (siehe 4.1.4.2) wurden abschließend ebenfalls auf Korrelationsanalysen zwischen HDAC Expressionen bei AML Patienten mit klinischem Ansprechen, kompletter Remission, Zeit bis Remission, Rezidiv Auftreten und Überleben durchgeführt.

Im Zusammenhang mit HDAC Expression und klinischem Ansprechen konnte eine signifikante Korrelation zwischen gesteigerter SIRT1 ( $p = 0,041$ ) und SIRT3 ( $p = 0,029$ ) Expression und kompletter Remission aufgedeckt werden (Abbildung 21).

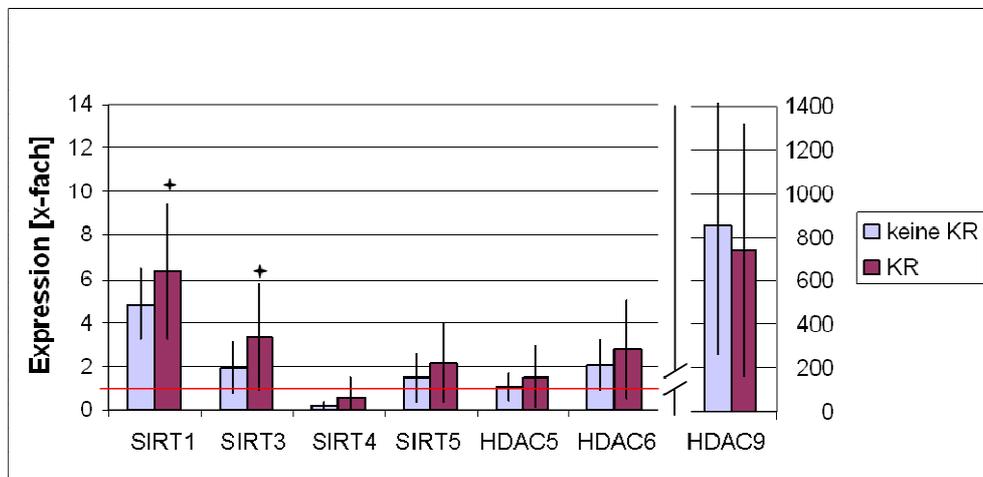


Abbildung 21: Korrelation durchschnittlicher HDAC Expressionen mit kompletter Remission (KR).

Eine genauere Gruppierung der Remission nach Zeitpunkt der Remission zeigte dabei eine noch stärker ausgeprägte, signifikantere Korrelation mit Remission nach Induktionstherapie II mit höheren Expressionssteigerungen aller HDACs (SIRT1 ( $p = 0,005$ ), SIRT3 ( $p = 0,001$ ), SIRT4 (geringere Abnahme ( $p < 0,001$ ), SIRT5 ( $p = 0,009$ ), HDAC5 ( $p = 0,014$ ) und HDAC6 ( $p = 0,002$ )) außer HDAC9 (Abbildung 22).

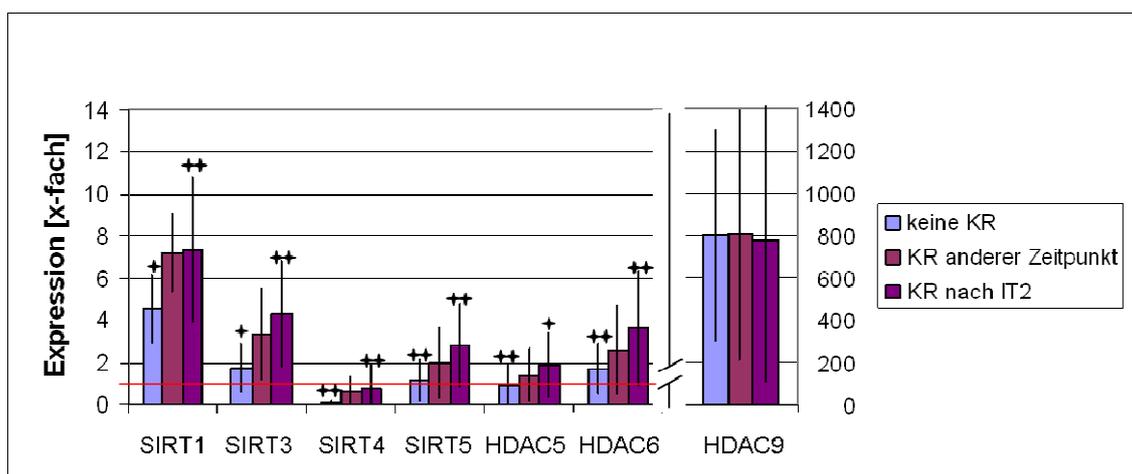


Abbildung 22: Korrelation der durchschnittlichen HDAC Expressionen mit Zeit bis zur kompletten Remission (KR).

Bei Betrachtung der Korrelation der HDAC Expression mit dem Auftreten eines Rezidivs (Abbildung 23) gab es keine signifikante Korrelation bis auf HDAC6 dessen erhöhte Expres-

sion ebenfalls signifikant ( $p = 0,008$ ) mit dem Auftreten von Rezidiven korrelierte, wobei die tendenziellen Unterschiede sehr denen der Korrelation mit kompletter Remission ähneln.

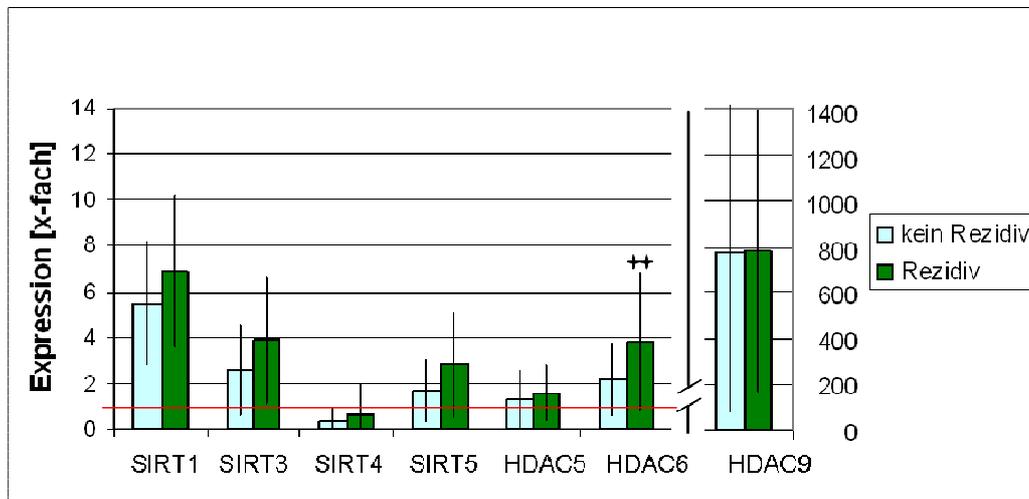


Abbildung 23: Korrelation der durchschnittlichen HDAC Expressionen mit Auftreten von Rezidiven.

In Bezug auf Überleben zeigte sich keine signifikante Korrelation zu der HDAC Expression.

### 3.1.7 Fazit der AML-Subtypspezifischen HDAC Expressionsanalysen

Zusammenfassend führten die AML-Subtypspezifischen Genexpressionsanalysen neben der Aufdeckung der charakteristischen HDAC Expressionsveränderungen zur Identifikation von AML M1 als ein Subtyp mit signifikant höherer Steigerung der Expressionslevel der analysierten HDACs (bis auf HDAC9). Weiterhin wurde eine Korrelation von gesteigerter SIRT3 und HDAC6 Expression bei AML mit Standardrisiko und normalen Karyotyp gegenüber AML mit  $inv(16)$  und aberrantem Karyotyp aufgedeckt (und die AML Gruppe mit der zytogenetischen Aberration  $t(8;21)$  zeigte signifikant geringere Steigerung von HDAC9 gegenüber den AML Gruppen mit anderen zytogenetischen Veränderungen). Außerdem zeigten die statistischen Analysen signifikante Korrelationen zwischen höheren HDAC Expressionsleveln und kompletter Remission (besonders nach IT2), und im Falle von HDAC6 auch mit dem Auftreten von Rezidiven, aber nicht mit dem Überleben.

Alle durchgeführten Kontroll-Korrelationsanalysen und Multivarianzanalysen bestätigten, dass andere Korrelationen keinen Einfluss auf die AML-Subtypspezifische HDAC Expressionssteigerung von AML M1 haben.

## 3.2 Klasse I HDAC SNPs im Rahmen der Pathogenese der AML

Aufgrund der beschriebenen Funktionen von Klasse I HDACs und HDAC9 in der Pathogenese von AML (1.4.1), sowie der beschriebenen Annahme über die Aufdeckung von „Single Nucleotide Polymorphisms“ (SNPs) Genotypen zusätzliche Informationen zur Beurteilung von Krankheitsanfälligkeiten und Entwicklung individuell angepasster Behandlungsstrategien (1.3) zu erlangen, wurden (in diesem Kontext) nicht synonyme SNPs (nsSNPs) in Klasse I HDACs per *in silico* Analyse und aus der Literatur identifiziert und mittels allelspezifischer TaqMan SNP-Assays analysiert (Dransfeld, *et al* 2007).

### 3.2.1 Identifikation von HDAC nsSNPs

Zur Identifikation putativer nsSNPs in Klasse I HDACs und HDAC9 wurden *in silico* Analysen mit drei Datenbanken durchgeführt (2.10.1, dbSNP Build 125), was zu 899 putativen validierten und nicht validierten SNPs führte, von denen 883 in Intronbereichen und 16 in Exonbereichen lagen. Die Analyse der HapMap Datenbank lieferte dabei keine validierten nsSNPs in den untersuchten HDACs. Von den 16 exonischen SNPs waren 6 synonyme und 10 nicht synonyme SNPs (Tabelle 13), welche aufgrund ihrer möglichen Auswirkungen auf Proteinfunktionalität oder Stabilität weiter analysiert wurden.

**Tabelle 13: Analyierte HDACs mit den identifizierten nicht synonymen SNPs.**

SNP zu den rs Nummern und C\_Nummern können den Datenbanken dbSNP (Smigielski, *et al* 2000) und AB (De La Vega, *et al* 2002) entnommen werden.

HDAC	Lokus / Exon	SNP	SNP-Lokalisierung				Datenbank
			Exon	as	as-pos.	Kodonpos.	
HDAC1	1p34.3 / 14	rs11541185	2	His/Asn	33	1 (C>A)	dbSNP
		rs11541183	5	Ser/Phe	150	2 (C>T)	dbSNP
		rs1140658	11	Ala/Gly	378	2 (C>G)	dbSNP
HDAC2	6q21- 6q22 / 14	rs17852888	9	His/Tyr	315	1 (C>T)	dbSNP
		rs1042903	7	Ser/Arg	230	3 (T>A)	dbSNP
		rs1042902	7	Stop/Arg	230	1 (T>A)	dbSNP
		rs1126963	4	Ala/Val	103	2 (C>T)	dbSNP
HDAC3	5q31 / 15	rs11546659	2	Lys/Arg	44	2 (A>G)	dbSNP
		rs467744 / = C_982763_20	10	Pro/Arg	265	2 (C>G)	dbSNP AB
		rs34901743 / = C_25629707_10	15	Asp/Ser	408	2 (A>G)	dbSNP AB
		keine					
HDAC8	Xq13 / 11	keine					
HDAC9	7p21.1 / 9	keine					

Neun der zehn nsSNPs wurden über die dbSNP Datenbank identifiziert, darunter drei nsSNPs für HDAC1 (rs11541185, rs11541183, rs1140658), vier für HDAC2 (rs17852888, rs1042903, rs1042902, rs1126963) und drei für HDAC3 (rs11546659, rs467744, rs34901743), wobei die

letzten beiden auch über die Datenbank von AppliedBiosystems identifiziert (C\_25629707\_10 und C\_982763\_20) wurden. Für HDAC8 und HDAC9 wurden keine nsSNPs gefunden.

### 3.2.2 Validierung der HDAC SNPs in gesunden Probanden vs AML Patienten

Die identifizierten putativen 10 nsSNPs wurden daraufhin zur Validierung und Analyse auf mögliche Frequenzunterschiede in jeweils 279 DNA Proben von gesunden Probanden und AML Patienten (Tabelle 14) mittels allelspezifischen SNP-Assays analysiert. Dabei konnte der putative HDAC1 nsSNP rs1140658 nicht analysiert werden, da der entsprechende allelspezifische Assay nicht herstellbar war.

**Tabelle 14: Patientendaten der 279 AML Patienten der Klasse I HDAC SNP Analysen.**

<b>Geschlecht</b>	<b>Weiblich</b>	<b>Männlich</b>	<b>Gesamt</b>
<b>Patientenanzahl</b>	144	135	279
<b>Alter [Jahre]</b>			
Durchschnitt	52.1	52.6	52.35
Intervall	18-76	18-78	18-78
≤ 29	9.8 % (14)	8.8 % (12)	9.3 % (26)
30-59	37.5 % (54)	51.2 % (69)	44.4 % (124)
≥ 60	52.7 % (76)	40 % (54)	46.2 % (129)
<b>Krankheitsstatus</b>			
Sekundäre AML	16.7 % (24)	15.6 % (21)	16.2 % (45)
De novo AML	81.9 % (118)	82.2 % (111)	82 % (229)
unbekannt	1.4 % (2)	2.2 % (3)	1.8 % (5)
<b>FAB-Subtypen</b>			
M0	4.8 % (7)	4.4 % (6)	4.7 % (13)
M1	20 % (29)	21.5 % (29)	20.8 % (58)
M2	38.9 % (56)	33.3 % (45)	36.2 % (101)
M3	0	0	0
M4	11.8 % (17)	11.9 % (16)	11.8 % (33)
M4/E0	3.5 % (5)	9.6 % (13)	6.5 % (18)
M5a	14 % (20)	10.4 % (14)	12.2 % (34)
M5b	4.2 % (6)	5.2 % (7)	4.7 % (13)
M5	0.7 % (1)	0	0.4 % (1)
M6	1.4 % (2)	3 % (4)	2.2 % (6)
M7	0.7 % (1)	0.7 % (1)	0.7 % (2)

Die Ergebnisse der Frequenzanalyse der identifizierten putativen nsSNPs zeigten, dass sowohl in den Proben der gesunden Probanden, als auch den Proben der AML Patienten, d.h. in insgesamt 558 Proben bei allen analysierten HDACs nur das wildtyp Allel (100 %) auftrat (Abbildung 24).

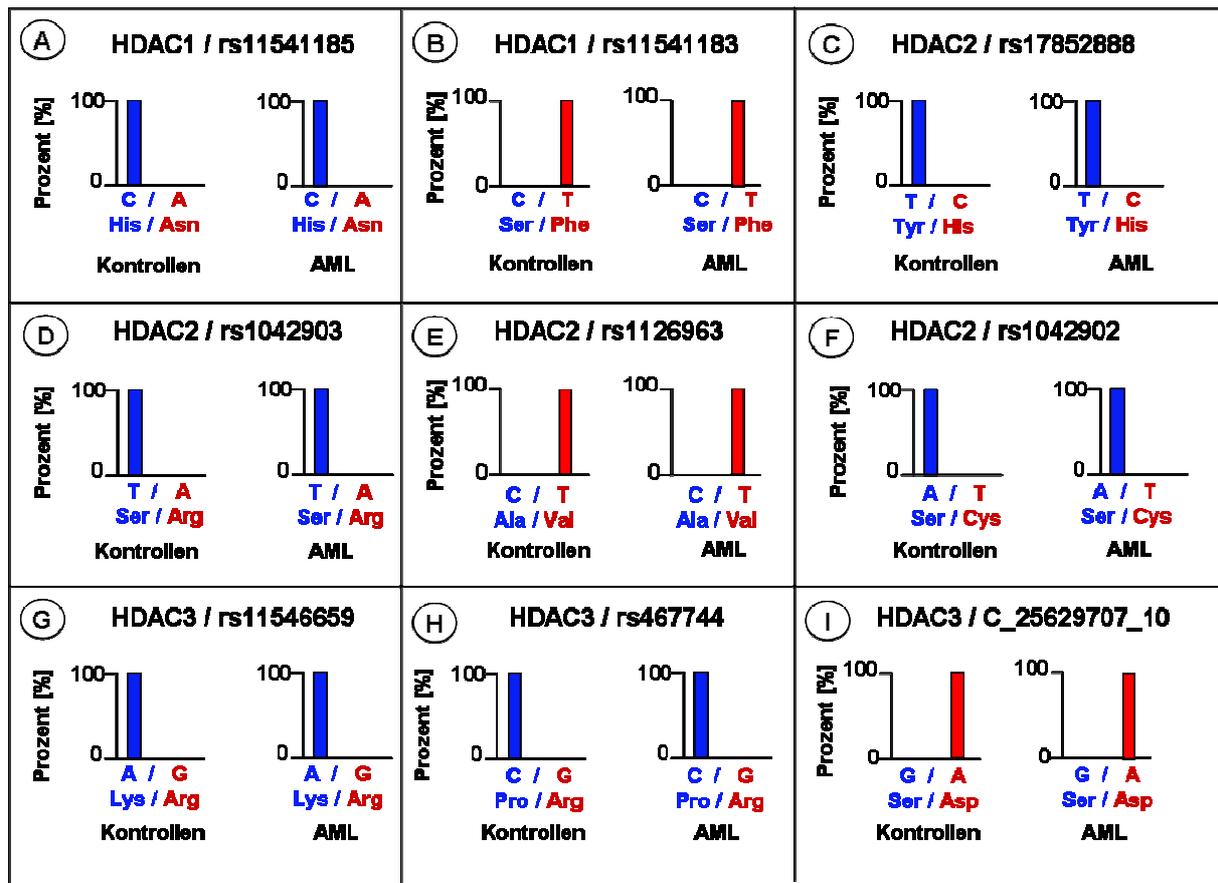


Abbildung 24: Alleldiskriminierung zur Validierung und Frequenzanalyse der identifizierten HDAC nsSNPs bei gesunden Probanden und AML Patienten.

Da keine nsSNPs in den analysierten Klasse I HDACs und HDAC9 bestätigt wurden, konnten entsprechend keine weiterführenden Korrelationsstudien durchgeführt werden, sondern festgehalten werden, dass keine nsSNPs mit putativen Funktionen in der Pathogenese von AML existieren (Dransfeld, *et al* 2007).

### 3.3 SIRT3 SNPs – Identifikation, Validierung, funktionelle Analyse

Aufgrund der immer deutlicher werdenden zentralen Rolle von SIRT3 in verschiedenen zentralen zellulären Prozessen wie der Stressantwort, der Apoptose, der Zellzyklus Regulation und besonders im zellulären Energiemetabolismus (1.1.3.4) als die Hauptdeacetylase in Mitochondrien und aufgrund der Korrelationen von SIRT3 Expressionsveränderungen mit verschiedenen Tumoren (1.1.4), wie auch der identifizierten SIRT3 Genexpressionsveränderung in AML (3.1), wurde SIRT3 auf vorhandene nsSNPs und deren funktionellen Einfluss auf SIRT3 Aktivität, Stabilität und auf SIRT3 Funktionen im zellulären Energiemetabolismus analysiert (Dransfeld, *et al*).

#### 3.3.1 Identifikation putativer SIRT3 nsSNPs

Die Identifikation putativer SNPs erfolgte mittels *in silico* Analysen von drei SNP Datenbanken (-> Methodenteil Link) sowie der Literatur und lieferte 6 putative SNPs (R80W, V208I, R214G, T255N, G369S und eine rs7927733, Tabelle 15).

Tabelle 15: Putative SIRT3 SNPs.

dbSNP rs-Nummer	AB Assay- Nummer	Sequenz [Vic/Fam] (sense/anti sense = s/as)	Exon	Kodon- position	AS- Austausch
rs28365927	C__25753927_10	CTCC[A/G]GAAT (as)	1	1	R80W
rs11246020	C__25754220_10	GTGA[C/T]GTTG (as)	3	1	V208I
rs1734492	C__7503249_10	AGCC[C/G]GAGA (as)	3	1	R214G
rs1734491	C__7503273_10	GCAG[G/T]TGGC (as)	4	2	T255N
rs3020901	SIRT3_0901-0901	ACGC[C/T]GTGA (as)	6	1	G369S
rs7927733	SIRT3_5927-5927	TTTTTC[A/C]GGTG (s)	Intron 5	---	Splicestelle

SIRT3<sub>R80W</sub> ist im N-Terminus lokalisiert, der beim mitochondrialen Import prozessiert wird (Abbildung 25). SIRT3<sub>V208I</sub>, SIRT3<sub>R214G</sub> und SIRT3<sub>T255N</sub> liegen in der konservierten Deacetylierungs-/ Aktivitätsdomäne und SIRT3<sub>G369S</sub> befindet sich im C-Terminus. Ein SNP rs7927733 befindet sich in Intron 5 in einer putativen Splicestelle.

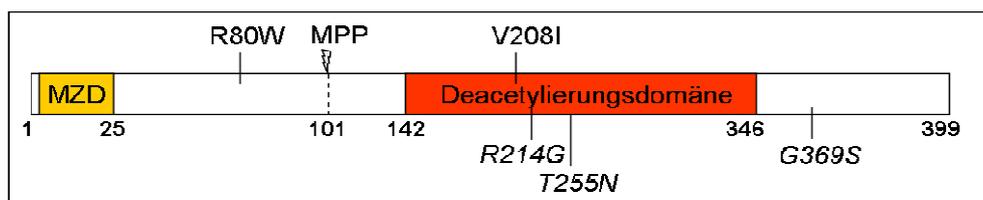


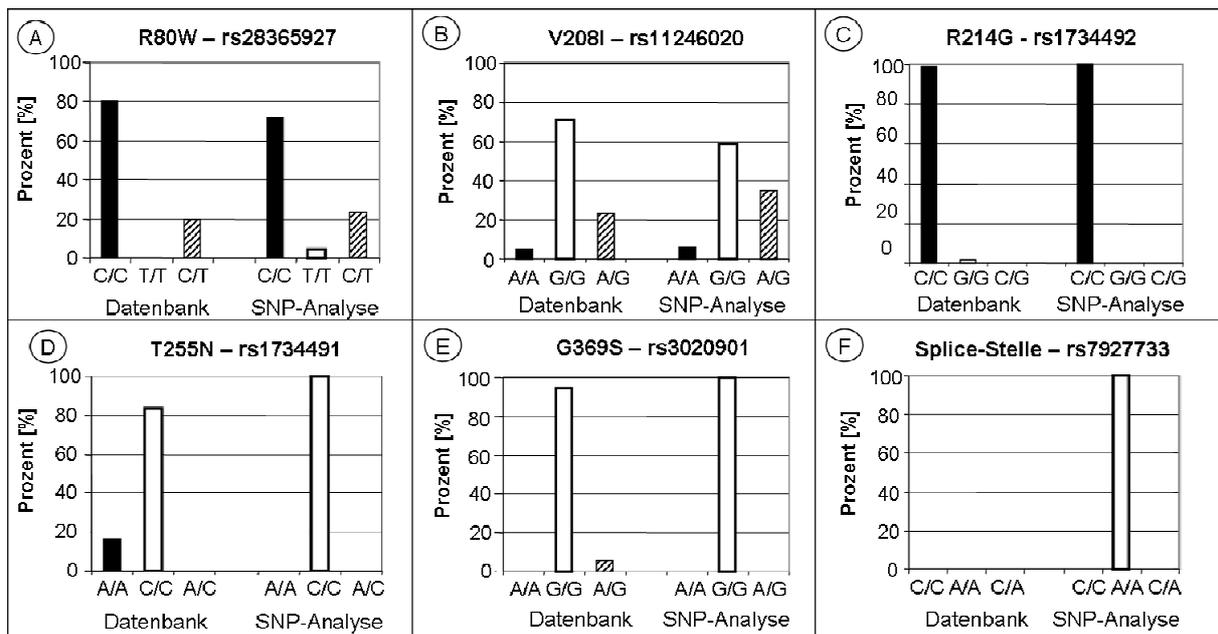
Abbildung 25: Lokalisierung identifizierter SNPs in SIRT3 Domänen.

Als Falschpositive aufgedeckte SNPs sind kursiv geschrieben. MZD = Mitochondriale Zieldomäne, MPP = Matrix prozessierende Peptidase.

### 3.3.2 Validierung putativer SIRT3 nsSNPs

Die Validierung der identifizierten putativen SIRT3 nsSNPs mittels allelspezifischen Taqman-PCR Assays (2.7.11) erfolgte mit genomischer DNA von 640 gesunden kaukasischen Probanden und wurde (falls vorhanden) mit Datenbankangaben verglichen (Abbildung 26).

Während die beiden SIRT3 SNPs R80W und V208I bestätigt werden konnten, wurden die anderen vier SNPs als Falschpositive oder zumindest als in der kaukasischen Bevölkerung nicht vorkommend aufgedeckt, da sie zu 100 % das wildtyp Allel aufwiesen.



**Abbildung 26: Frequenzanalyse und Validierung der identifizierten putativen SIRT3 SNPs in 640 gesunden kaukasischen Probanden.**

Die dargestellten Allelsignale entsprechen den Fluoreszenzsignalen der angewendeten SNP-Assays (Tabelle 15), die in die Allele des Sinnstrangs übertragen wurden. Die Datenbankangaben entstammen HapMap und dbSNP ((Int.-HapMap-Consortium 2003), dbSNP Build ID: build 126), vgl. (Dransfeld, *et al*)).

Die Genotypfrequenzanalysen für SIRT3<sub>R80W</sub> zeigten, dass 72 % homozygot (C/C) für das wildtyp Allel, 23,5 % heterozygot (C/T) und 4,5 % homozygot (T/T) für das variante Allel waren. Zum Zeitpunkt dieser Analysen gab die Datenbank (dbSNP Build ID: build 126) nur Informationen zu SIRT3<sub>R80W</sub> in der afrikanischen Bevölkerung (80,6 % C/C, 19,4 % C/T).

Für SIRT3<sub>V208I</sub> ergab sich eine Genotypfrequenz von 60 % homozygot für das wt Allel (G/G), 35 % heterozygot (G/A) und 6 % für homozygot für das variante Allel (A/A) im Vergleich zu 72, 23 und 5 % in der Datenbank (HapMap, (Int.-HapMap-Consortium 2003)).

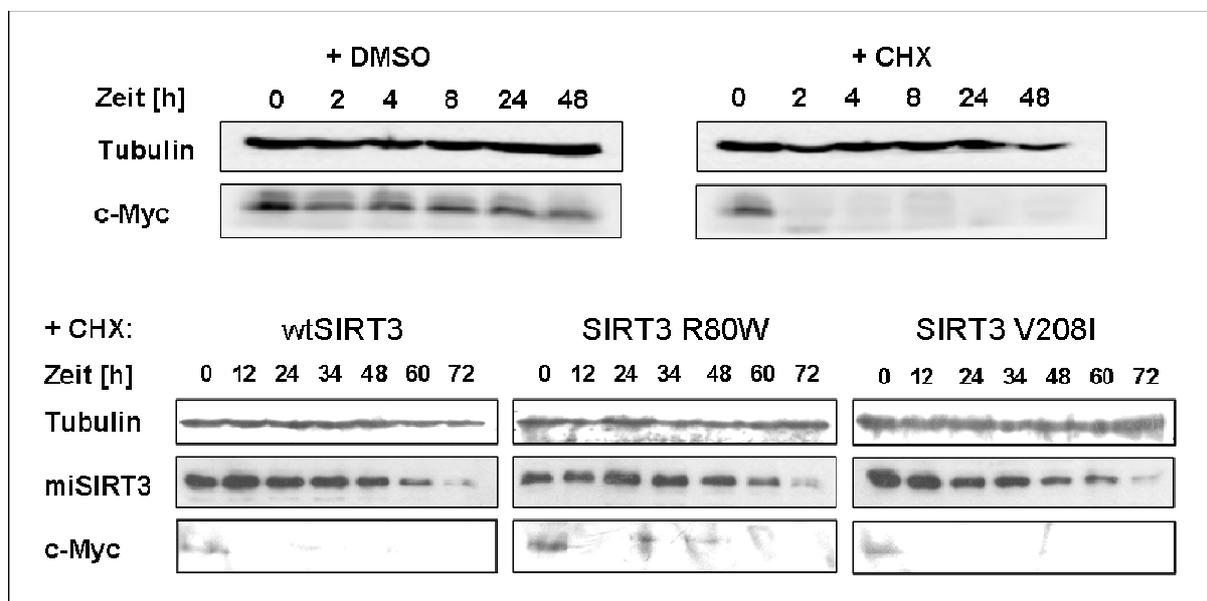
Die Genotypfrequenzen von SIRT3<sub>R80W</sub> (1,866) und SIRT3<sub>V208I</sub> (0,087) sind beide in Einklang mit dem Hardy-Weinberg-Gleichgewicht ( $p = 0,172$  und  $p = 0,766$ ).

### 3.3.3 Funktionelle Analysen validierter SIRT3 SNPs

Um einen putativen Einfluss der bestätigten SIRT3 SNPs auf die Aktivität und Stabilität von SIRT3 zu analysieren und festzustellen, ob sich die validierten SNPs für zukünftige Assoziationsstudien eignen, wurden funktionelle Analysen durchgeführt.

#### 3.3.3.1 Analyse des Einflusses der SIRT3 nsSNPs auf die SIRT3 Stabilität

Zur Analyse der SIRT3 Stabilität wurden HeLa Zellen mit SIRT3-Flag Vektoren (wtSIRT3, SIRT3<sub>R80W</sub>, SIRT3<sub>V208I</sub>) transfiziert und 24 h nach Transfektion mit dem Inhibitor der Proteinsynthese Cycloheximid (CHX) [40µg/ml] für bis zu 72 h inkubiert und (nach Probenentnahme und Proteinisolierung) mittels Western-Blot analysiert (Abbildung 27).



**Abbildung 27: Stabilitätsanalyse von wtSIRT3 und des Einflusses von SIRT3 SNPs**

SIRT3 (wt, R80W, V208I) transfizierte Zellen wurden mit CHX (Cycloheximid) inkubiert und kinetisch analysiert mit Western-Blot auf Tubulin, c-Myc und SIRT3 (mitochondriales SIRT3 = miSIRT3; (Dransfeld, *et al*)).

Um den Effekt von CHX zu kontrollieren und visualisieren, wurden die Signale von c-Myc analysiert, welches eine sehr geringe Halbwertszeit (< 30 min) besitzt (Escamilla-Powers and Sears 2007, Gregory and Hann 2000). Die c-Myc Signale waren schon nach 2 h CHX Behandlung so stark reduziert, dass keine Signale mehr zu erkennen waren, während sie bei Inkubation mit der gleichen Menge Dimethylsulfoxid (DMSO), in welchem CHX gelöst war, stabile Signale aufwiesen, was zeigte, dass DMSO keinen Effekt auf die Proteinsynthese hatte. Im Gegensatz zu der schnellen Reduktion der c-Myc Signale blieben die Signale von mitochondrialem SIRT3 (mSIRT3) relativ konstant mit ersten Abnahmen der Signalstärke nach 34 h CHX Behandlung.

Die vergleichenden Stabilitätsanalysen zwischen wtSIRT3 und den beiden SNP Varianten ließen keine signifikanten Unterschiede bei der Stabilität erkennen.

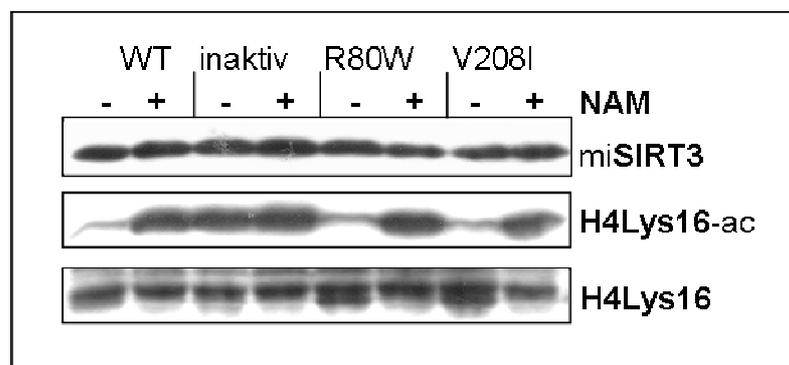
Nach 72 h waren in allen Fällen nur noch minimale Restsignale zu erkennen und die halbmaximalen Signale schienen bei ca. 48 h nach Cycloheximid [40 µg/ml] Zugabe zu liegen.

### 3.3.3.2 Analyse des Einflusses der SIRT3 nsSNPs auf SIRT3 Aktivität

Beide validierten SIRT3 SNPs R80W und V208I führen zu Veränderungen auf Aminosäureebene und könnten entsprechend die funktionelle Aktivität von SIRT3 beeinflussen.

Basierend auf der Histon-Deacetylaseaktivität von SIRT3 auf H4<sub>K16</sub> (Vaquero, *et al* 2007) wurde die Deacetylierungsaktivität von wtSIRT3 und den SIRT3 SNP Mutanten über einen Deacetylierungsassay (2.8.7) mit hyperacetylierten Histonen analysiert, um einen putativen Einfluss der SNPs auf die SIRT3 Aktivität zu erfassen. Dabei wurden gleiche Mengen an hyperacetylierten Histonen für den gleichen Zeitraum mit und ohne dem Sirtuin-Inhibitor Nikotinamid (NAM) und den gleichen Mengen an (über Flag-Agarose-beads und die Flag-tags der Konstrukte) aufgereinigtem wtSIRT3, SIRT3<sub>R80W</sub> und SIRT3<sub>V208I</sub> inkubiert und mittels Western-Blot untersucht (Abbildung 28).

Die Western-Blot Analysen mit spezifischen Antikörpern gegen SIRT3 und gesamt und acetyliertes H4<sub>K16</sub> zeigten deutlich reduzierte Signale bei Ansätzen mit wtSIRT3 und den SNP Mutanten, wobei kein signifikanter Unterschied zu erkennen war. Inkubation mit dem Inhibitor NAM als auch Inkubation mit inaktivierter SIRT3 Mutante blockierte die Deacetylierungsaktivität und führte ebenfalls zu gleich starken Signalen bei wtSIRT3 und den SNP Mutanten. (Dransfeld, *et al*)



**Abbildung 28:** Analyse der SIRT3 SNPs auf Aktivität im Vergleich zu wtSIRT3 durch Deacetylierungsassay.

Die gleichen Mengen aufgereinigter hyperacetylierter Histone und wtSIRT3, SIRT3<sub>H248Y</sub> (inaktiv), SIRT3<sub>R80W</sub> und SIRT3<sub>V208I</sub> wurden für 20 min in HDAC-Assay Puffer (mit NAD) und mit und ohne NAM inkubiert und mittels Western-Blot analysiert (Dransfeld, *et al*).

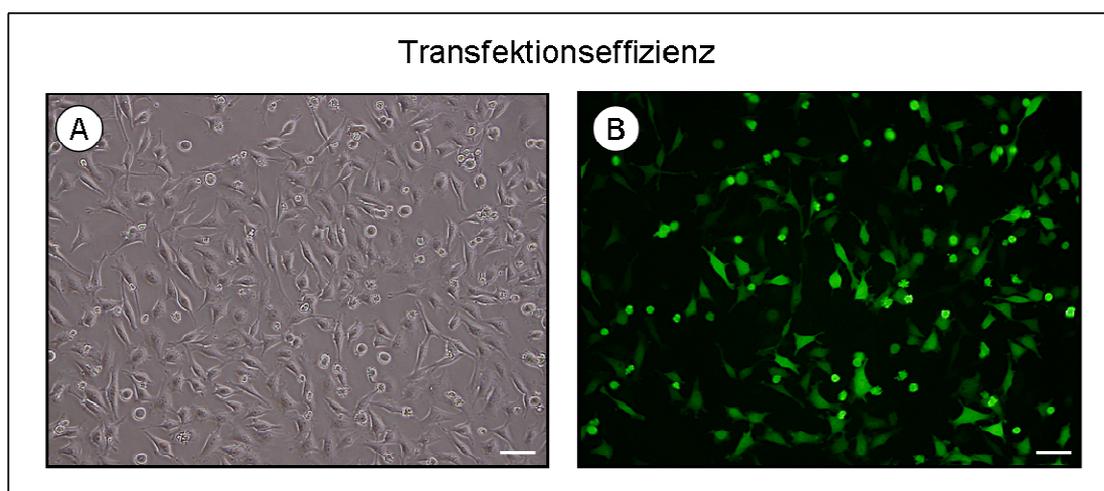
### 3.3.4 Monitoring der SIRT3 Bioaktivität und Einfluss der SIRT3 SNPs mittels Biosensor-Chip-System

Um abschließend alle möglichen Einflüsse der beiden SIRT3 SNPs zu erfassen und zu klären, ob sie tatsächlich keinen signifikanten Einfluss (auf SIRT3 Aktivität, Stabilität bzw.) auf die zentrale Funktion von SIRT3 im Energiestoffwechsel haben, wurde im Rahmen dieser Arbeit eine neue Methode etabliert. Durch Kombination von transienter Transfektion und einem Biosensor-Chip-System sollte der Einfluss eines einzelnen Proteins und deren Mutanten auf den zellulären Energiemetabolismus erfasst werden, wobei das Biosensor-Chip-System den zeitlichen Verlauf von Respiration, Glykolyse und Adhäsion über verschiedenen Elektroden / Sensoren messen und aufzeichnen kann (2.5).

SIRT3 stellte ein ideales Beispiel-Protein zur Etablierung der Methode dar, da es einen nachgewiesenen großen Einfluss auf den zellulären Energiemetabolismus besitzt (1.1.3.5).

#### 3.3.4.1 Etablierung der Transfektions-Biosensor-Chip Analysen

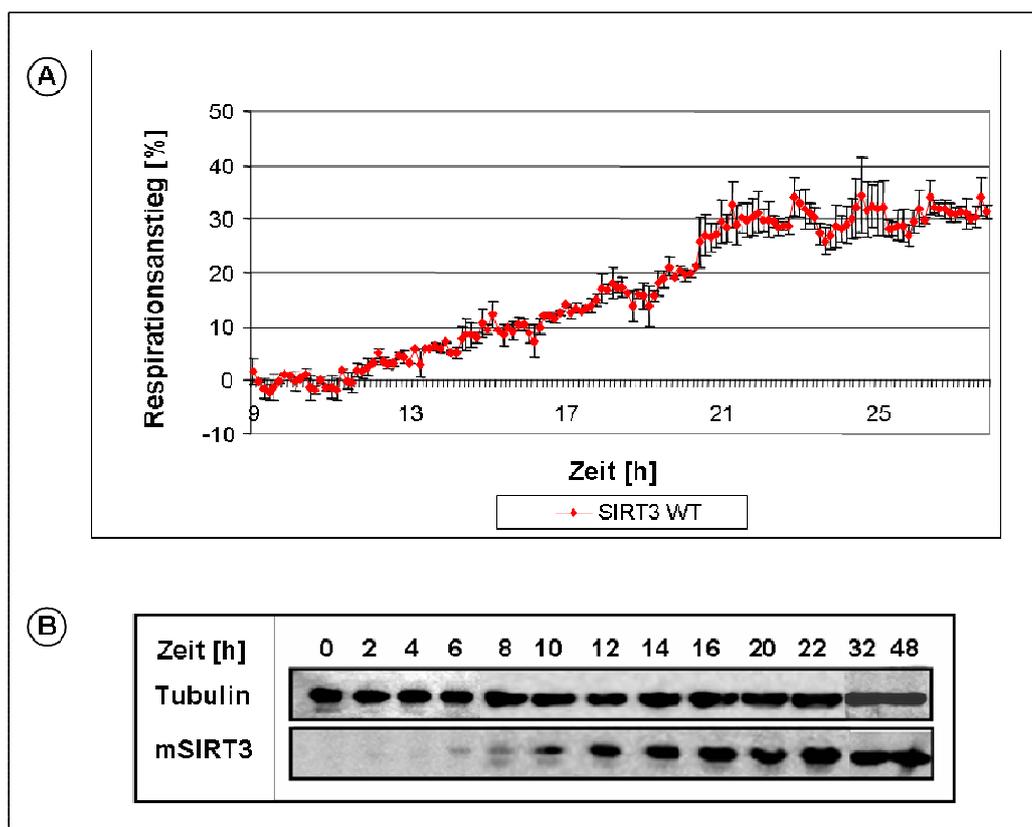
Als erstes wurden verschiedene Zelllinien, H1299, HEK293 T und HeLa Zellen, welche schon in früheren Studien in dem System eingesetzt wurden (Harlos, *et al* 2008, Schatzschneider, *et al* 2008), auf Transfizierbarkeit und Langzeitverhalten auf den Biosensor Chips getestet. Dabei wurden HEK293 T und HeLa Zellen als die geeignetsten Zellen für die Kombination transienter Transfektion und nachfolgender Analyse im Biosensor-Chip-System identifiziert, wobei HeLa Zellen mit 50-60 % (Abbildung 29) sowohl bei Nanofektion, als auch Amaxa-Nukleofektion die bessere Transfektionseffizienz aufwiesen.



**Abbildung 29: Optimale Transfektionseffizienz – Bsp. Amaxa Transfektion von wtSIRT3 in HeLa Zellen.**  
A) Phasenkontratsaufnahme, B) Fluoreszenzaufnahme. Balken = 40  $\mu\text{m}$ .

Außerdem waren HeLa Zellen aufgrund der langsameren Duplikationszeit gegenüber HEK293 T Zellen für Langzeitstudien besser geeignet. In allen Experimenten wurde die Transfektionseffizienz mit SIRT3-GFP Mutanten getestet.

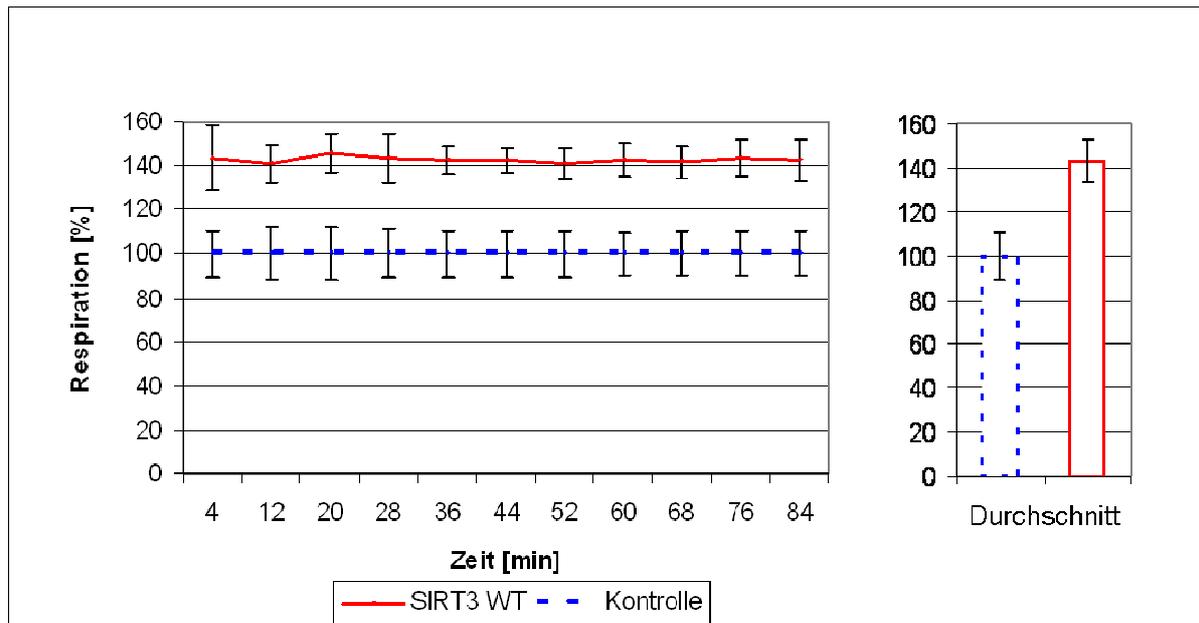
Um die Funktionsfähigkeit der Methode des „real-time Monitoring“ transient transfizierter Zellen mit sich anschließender Analyse im Biosensor-Chip-System zu beweisen, wurde die Kinetik der wtSIRT3 Überexpression mittels Western Blot mit gleichzeitig gemessenen Respirationswerten visualisiert (Abbildung 30). Dabei konnte gezeigt werden, dass die SIRT3 Überexpression mit einer zeitlichen Verzögerung von 1-2 h mit einem Anstieg der Respiration korreliert. Das Maximum der SIRT3 Signale auf Proteinebene trat nach ca. 18 bis 20 h auf und das Maximum der Respirationswerte nach ca. 20-22 h. Die maximale Respirationssteigerung nach Abgleich und Normalisierung (dabei wurden nur Unterschiede größer 5 % berücksichtigt) gegenüber den untransfizierten Zellen, inaktiver SIRT3 Mutante SIRT3 sowie Zellwachstum, ergab eine maximale Respirationssteigerung durch SIRT3 Überexpression von ca. 35 % (Abbildung 30).



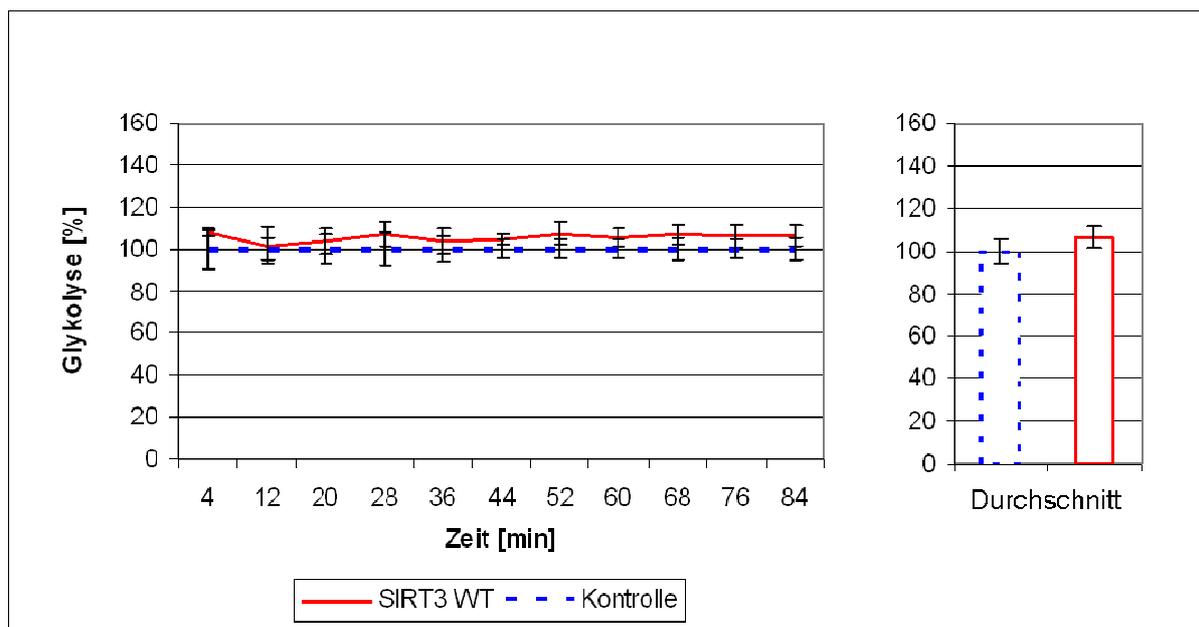
**Abbildung 30: Kinetik des wtSIRT3 induzierten Respirationsanstiegs im Vergleich zur Überexpression.**

A) Anstieg der Respiration nach SIRT3 Überexpression gemessen mit Bionas System. (Basis / Nulllinie = Kontrollen; d.h. der dargestellte Anstieg der Respiration ergab sich aus dem prozentualen Anstieg der wtSIRT3 transfizierten Zellen nach Abzug des prozentualen Anstiegs der Kontrollen (s. Text) und Berücksichtigung des Zellwachstums. (4 unabhängige Experimente) B) Parallele Detektion von mitochondrialem SIRT3 mittels Western Blot Analyse.

Nach dem Nachweis der Funktionalität der Methode und der Identifikation des Zeitpunkts der maximalen SIRT3 Überexpression wurden weitere vergleichende Analysen durchgeführt, wobei die Zellen 22 h nach Transfektion auf Transfektionseffizienz kontrolliert wurden und in gleicher Zellzahl in die Biosensor-Chips ausgesät wurden. Die Messungen in dem Biosensor-Chip System erfolgten 4 h nach Aussaat der transfizierten Zellen in Kurzzeitmessungen von 2-3 h (Abbildung 31, Abbildung 32).



**Abbildung 31: Respirationsanstieg durch wtSIRT3.**  
Durchschnittswerte ergeben sich aus 4 unabhängigen Experimenten.



**Abbildung 32: Kein signifikanter Einfluss von wtSIRT3 Überexpression auf Glykolyse.**  
Durchschnittswerte ergeben sich aus 4 unabhängigen Experimenten.

Dabei zeigte die transiente Transfektion von wtSIRT3 in HeLa Zellen mit einer Transfektionseffizienz von 50 – 60 %, dass SIRT3 Überexpression zu einem signifikanten Anstieg der Respiration um ca. 40 % führt (Abbildung 31), wohingegen Glykolyse (Abbildung 32) oder der Adhäsion (Daten nicht aufgeführt) keine signifikante Veränderung zeigten.

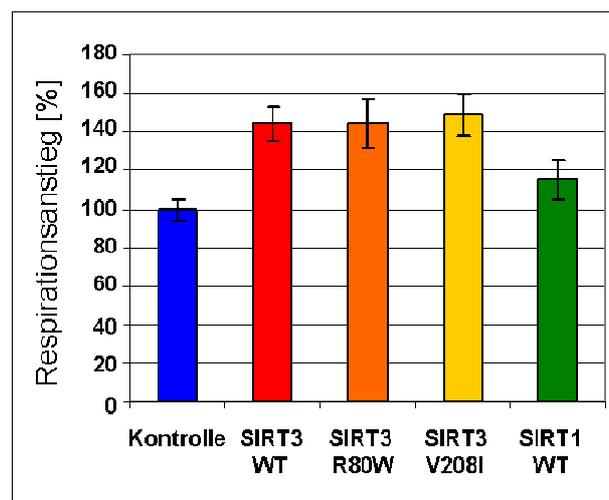
Es ist festzuhalten, dass durch die Verwendung von transienter Transfektion in Kombination mit dem Biosensor-Chip-System die Visualisierung und genaue Zeitkinetik des Effekts der SIRT3 Überexpression auf die Respiration in lebenden Zellen detektiert werden kann.

### 3.3.4.2 SIRT3 nsSNPs haben keinen Einfluss auf SIRT3 Bioaktivität

Nach der Etablierung der Methode wurde der Einfluss der beiden validierten SIRT3 SNPs auf die SIRT3 Bioaktivität speziell in Bezug auf den Energiemetabolismus bzw. die Respiration und Glykolyse analysiert. Dabei wurde neben der konstanten, gleichen Zellzahl besonders auf gleiche Transfektionseffizienz aller SIRT3 Konstrukte geachtet und Kurzzeitmessungen von 2-3 h durchgeführt.

Die vergleichenden Analysen zwischen wtSIRT3 und den SIRT3 SNP Mutanten zeigte, dass sich wie bei den Analysen zur Stabilität und Aktivität kein Einfluss der SNPs auf die Bioaktivität bzw. Respirationserhöhung durch SIRT3 Überexpression ergab (Abbildung 33) (wie schon der wt zeigten auch die SIRT3 SNP Mutanten keinen Einfluss auf die Glykolyse).

Der zusätzliche Vergleich mit wtSIRT1 zeigte, dass wtSIRT3 mit 40 % einen deutlich stärkeren steigernden Effekt auf die Respiration ausübt, als wtSIRT1 mit ca. 15 %.



**Abbildung 33: Ergebnisse der Biosensor-Chip Analysen des Einflusses der SIRT3 SNPs auf Respirationsanstieg im Vergleich zu wtSIRT3.**

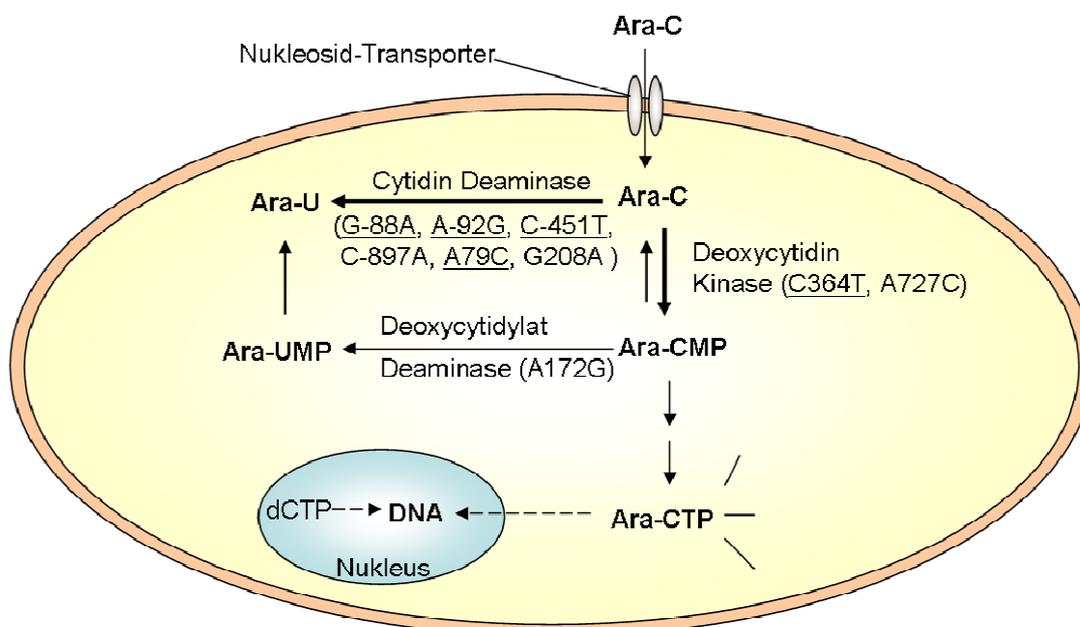
HeLa Zellen wurden mit äquimolaren Mengen wtSIRT3, SIRT3<sub>R80W</sub>, SIRT3<sub>V208I</sub> und wtSIRT1 transfiziert und nach 24h im Biosensor-Chip-System analysiert. Durchschnittswerte aus 3 unabhängigen Experimenten. Kontrolle = Untransfizierte und mit Leervektor als auch mit SIRT3<sub>H248Y</sub> (inaktiv) transfizierte HeLa. (Dransfeld, *et al*)

### 3.4 AML Pharmakogenetikik– SNPs in Ara-C metabolisierenden Enzymen

Zur Optimierung und besseren Prognose des patientenspezifischen Ansprechens bis zur Resistenz auf Therapie mit Ara-C (Cytarabin), dem bis heute effektivsten Chemotherapeutikum der AML Standardtherapie, wurden in der vorliegenden Arbeit speziell „Single Nucleotide Polymorphismen“ (SNPs) als häufigste mögliche genetische Ursachen untersucht, welche entweder als Promotor-SNPs die Expression eines Gens oder als nicht synonyme codierende SNPs (nsSNPs) die Proteinfunktion (Aktivität, Stabilität, Lokalisierung) beeinflussen können (Allali-Hassani, *et al* 2009). Dabei konzentrierten sich die Analysen auf entsprechende SNPs in drei Schlüsselenzymen des Ara-C Metabolismus: der Desoxycytidin Kinase (DCK), der Cytidin Deaminase (CDA) und der Deoxycytidylat Deaminase (DCTD) (vgl. 1.2.5.2, (Mahlknecht, *et al* 2009)).

#### 3.4.1 Promotor- und nsSNPs in Enzymen des Ara-C Metabolismus

Die *in silico* Analyse der Datenbanken dbSNP (NIH) (Smigielski, *et al* 2000), HapMap (2003) und von AppliedBiosystems (De La Vega, *et al* 2002) (vgl. 2.10.1) in Kombination mit SNPs aus der Literatur führte zur Identifikation von 11 SNP in den drei Schlüsselenzymen des Ara-C Metabolismus.



**Abbildung 34: Überblick Schlüsselenzyme des Ara-C Metabolismus mit analysierten SNPs.** Die bestätigten SNPs sind hervorgehoben (unterstrichen). (Mahlknecht, *et al* 2009)

Tabelle 16: CDA, DCK und DCTD Genotypen der 360 AML Patienten.

Gene/SNP	Lokus	Veränderung	n	%
<b>CDA A79C</b>	Exon 1	Lys27Gln		
Homozygot wt	1_1 (A_A)	Lys	147	41
Heterozygot	1_2 (A_C)	Lys/Gln	164	45
Homozygot v	2_2 (C_C)	Gln	49	14
<b>CDA G-88A</b>	Promotor			
Homozygot wt	1_1 (G_G)	Veränderung der TF Bindestelle ?	354	98,7
Heterozygot	1_2 (G_A)		5	1
Homozygot v	2_2 (A_A)		1	0,3
<b>CDA G208A</b>	Exon 2	Ala70Thr		
Homozygot wt	1_1 (G_G)	Ala	360	100
Heterozygot	1_2 (G_A)	Ala/Thr	0	0
Homozygot v	2_2 (A_A)	Thr	0	0
<b>CDA A-92G</b>	Promotor			
Homozygot wt	1_1 (A_A)	Veränderung der TF Bindestelle ?	151	42
Heterozygot	1_2 (A_G)		161	45
Homozygot v	2_2 (G_G)		48	13
<b>CDA C-451T</b>	Promotor			
Homozygot wt	1_1 (C_C)	Veränderung der TF Bindestelle ?	147	41
Heterozygot	1_2 (C_T)		163	45
Homozygot v	2_2 (T_T)		50	14
<b>CDA C-897A</b>	Promotor			
Homozygot wt	1_1 (C_C)		360	100
Heterozygot	1_2 (C_A)		0	0
Homozygot v	2_2 (A_A)		0	0
<b>DCK C364T</b>	Exon 3	Pro122Ser		
Homozygot wt	1_1 (C_C)	Pro	353	98
Heterozygot	1_2 (C_T)	Pro/Ser	7	2
Homozygot v	2_2 (T_T)	Ser	0	0
<b>DCK A727C</b>	Exon 6	Lys242Gln		
Homozygot wt	1_1 (A_A)	Lys	359	99,7
Heterozygot	1_2 (A_C)	Lys/Gln	1	0,3
Homozygot v	2_2 (C_C)		0	0
<b>DCTD A172G</b>	Exon 4	Asn58Asp		
Homozygot wt	1_1 (A_A)	Asn	360	0
Heterozygot	1_2 (A_G)	Asn/Asp	0	0
Homozygot v	2_2 (G_G)	Asp	0	0

Dabei wurden die meisten für die Ara-C irreversibel inaktivierende Cytidin Deaminase (CDA) gefunden mit vier Promotor SNPs (G-88A, A-92G, C-451T (dbSNP: rs532545), C-

897A (dbSNP: rs10916823)) und zwei nsSNPs (A79C (dbSNP: rs2072671), G208A) (Abbildung 34, Tabelle 16). Für die Deoxycytidylat Deaminase (DCTD) wurde nur ein nsSNP (A172G) gefunden und für die Ara-C aktivierende Deoxycytidin Kinase (DCK) wurden zwei nsSNPs (C364T, A727C) und zwei Promotor SNPs (C-360G and C-201T) identifiziert. Die Promotor-SNPs von DCK (C-360G und C-201T) konnten nicht analysiert werden, da die entsprechenden SNP-Assays nicht hergestellt werden konnten.

### 3.4.1.1 Genotyp Frequenzanalysen – Validierung der identifizierten SNPs

Die Validierung (Frequenzanalyse) der SNPs erfolgte über allelspezifische TaqMan-PCR SNP-Assays an 360 AML Proben (Kaukasische Bevölkerung) und bestätigte den DCK nsSNP C364T, sowie vier CDA SNPs (A79C, G-88A, A-92G, C-451T). Die Promotor-SNPs von DCK (C-360G und C-201T) konnten nicht analysiert werden, da die entsprechenden SNP-Assays nicht hergestellt werden konnten. Die anderen putativen SNPs konnten nicht bestätigt werden, da sie entweder in allen Proben nur ein Allel aufwiesen (CDA SNP C-897A, G208A und DCTD SNP A172G) oder das Vorkommen des Varianten Allels wie im Falle von DCK SNP A727C, C364T und CDA SNP G-88A unter 1 bzw. 2 und 1,3 % lag (Abbildung 35, Tabelle 16).

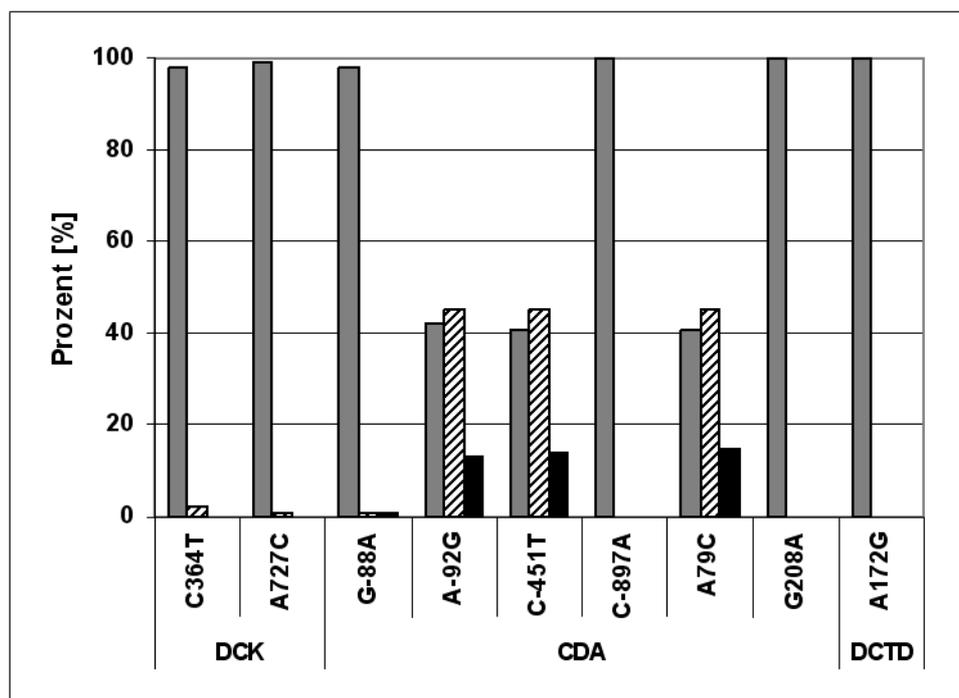


Abbildung 35: Alleldiskriminierung (Genotyp Frequenzanalyse) der identifizierten SNPs der drei ausgewählten Schlüsselenzyme des Ara-C Metabolismus. (Mahlknecht, *et al* 2009)

Des Weiteren zeigte die Analyse der Genotypfrequenzen, dass nur die Frequenzen von CDA SNP A79C, A-92G und C-451T in Einklang mit der Hardy-Weinberg Vorhersage stehen ( $p = 0,82$ ;  $p = 0,65$  und  $p = 0,65$ ) und dass diese drei SNPs in einem „Kopplungsungleichgewicht“ (Linkage disequilibrium) zueinander waren, d.h. sie treten häufiger gemeinsam auf (was sich durch die Verteilung der Kombinationen der Allelvarianten (Kopplungsungleichgewichtskoeffizient  $D'$  0,92; 0,92 und 0,96 für SNP A79C/A-92G, SNP A79C/C-451T und SNP A-92G/C-451T) widerspiegelt). Die Genotypfrequenzen der SNPs mit 1-2 % Vorkommen des varianten Allels waren weit außerhalb des Hardy-Weinberg Gleichgewichts und wurden, wie auch die „SNPs“ mit 100 % wildtyp Allel Vorkommen, entsprechend nicht weiter analysiert.

### 3.4.2 Korrelationsanalysen der Cytidin Deaminase (CDA) Genotypen

Die bestätigten CDA SNPs und ihre Genotypen wurden mit den Patientendaten (Tabelle 17, 2.6) statistischen Korrelationsanalysen unterzogen. Die Genotypen der CDA SNPs A79C, A-92G und C-451T zeigten dabei keinen signifikanten Einfluss auf Gehalt weißer Blutzellen (WBC), roter Blutzellen (RBC), Thrombozyten, Knochenmark Blasten oder CD34 Expression. Trotzdem zeigten Patienten mit CDA SNP C-415T (T\_T) signifikant ( $p = 0,01$ ) höhere Laktatdehydrogenase (LDH) im Vergleich zu den heterozygoten und Wildtyp Genotypen (C\_T und C\_C), wohingegen die anderen beiden SNPs keine solchen Korrelationen zeigten. Korrelationen mit den molekularen Markern FLT3 und NPM1 ergaben, dass der CDA SNP C-415T (T\_T) häufiger mit der FLT3-ITD Mutation assoziiert ist (46,6 %), als die der heterozygote (26,6 %) oder der wildtyp Genotyp (26,6 %) ( $p = 0,03$ ). Die Genotypen der anderen beiden SNPs zeigten wiederum keine solchen Unterschiede.

In Bezug auf Alter, Krankheitsstatus, FAB Klassifikation (Subtypen), ECOG Leistungs-Status (Eastern Cooperative Oncology group performance Status) und zytogenetische Aberrationen zeigten sich keine Ungleichheiten zwischen den unterschiedlichen Genotypen.

Die Korrelation von CDA SNP Genotypen mit Ara-C behandlungsbedingten toxischen Nebenwirkungen wie Grad III/IV Augentoxizität (starke Keratitis mit Kornea Ulzeration, akutes Glaukom, objektiver Visusverlust) (bei 4/360), Hautschäden (8/360), Gastrointestinaltoxizität (116/360), Lebertoxizität (62/360) und Schädigung des zentralen Nervensystems (20/360) ergab, dass Patienten mit homozygot varianten Allelen bei allen drei CDA SNPs eine höhere Inzidenz für Grad III/IV Augentoxizität aufzeigten im Vergleich zu den heterozygoten und homozygot wildtyp Genotypen ( $n = 4$  vs  $0$  vs  $1$ ,  $p = 0,05$  für jeden SNP). Für die anderen Nebenwirkungen wurden keine Korrelationen gefunden. (Mahlknecht, *et al* 2009)

Tabelle 17: Patientendaten der 360 AML Patienten der Analysen der Ara-C metabolisierenden Enzyme.

	Anzahl	Anzahl	%	Durchschnitt (Bereich)
<b>Geschlecht</b>	360			
(männlich/weiblich)		180/180	50/50	
<b>Alter [Jahre]</b>	360			57 (18-79)
<b>Knochenmark Blasten [%]</b>	329			64 (20-99)
<b>WBC [Gpt/L]</b>	358			26.0 (0.5-465.9)
<b>CD34 positiv [%]</b>	343			27 (0-98)
<b>ECOG Status</b>	293			
<b>0/1</b>		155	53	
<b>2/3</b>		128	44	
<b>4/5</b>		10	3	
<b>FAB Klassifikation</b>	360			
M0		14	4	
M1		76	21	
M2		134	37	
M4		66	18	
M5		60	17	
M6		8	2	
M7		2	1	
<b>Krankheitsstatus</b>	360			
De novo		303	84	
Sekundär		57	16	
<b>FLT3-ITD</b>	355			
Positiv		104	29	
Negativ		251	71	
<b>NPM1 Mutation</b>	358			
Positiv		118	33	
Negativ		240	67	
<b>Zytogenetik</b>	347			
Geringes Risiko		20	6	
Mittleres Risiko		253	73	
Hohes Risiko		74	21	

### 3.4.2.1 Identifikation von CDA SNP C-451T als neuen prognostischen Marker

Ein weiteres Ziel der Studie war es herauszufinden, ob es einen Einfluss der CDA SNPs auf das Therapieansprechen und Überleben gibt.

Insgesamt erreichten 185 der 360 AML Patienten (51 %) eine komplette Remission nach Ara-C Doppel-Induktionstherapie. Während die Genotypen der CDA SNPs und ihre Kombinationen keinen signifikanten Einfluss auf das Therapieansprechen hatten, zeigte sich eine schlechtere 5 Jahres Gesamtüberlebensrate für CDA SNP C-451T mit dem homozygot varianten Genotyp (T\_T) im Vergleich zum Wildtyp (13 vs 25 % ( $p = 0,05$ )) (Abbildung 36)).

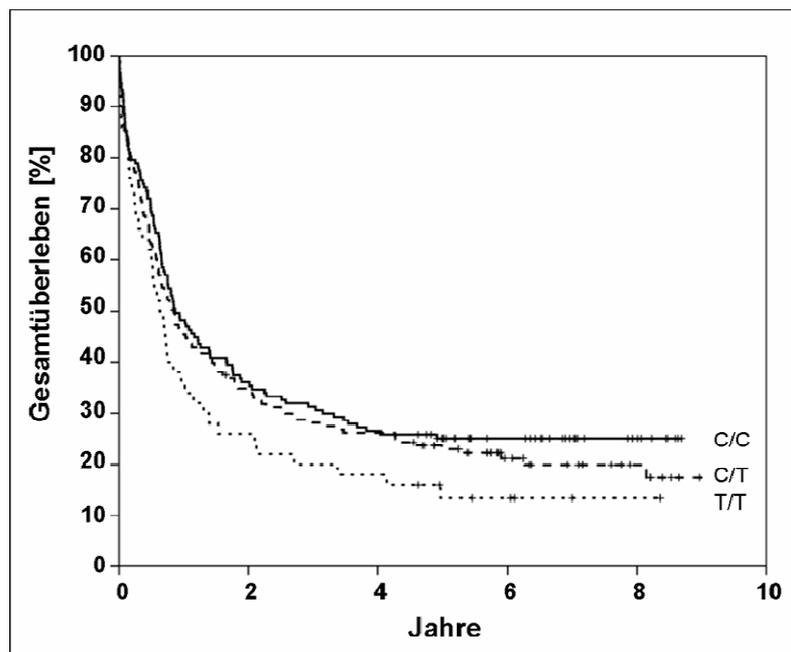
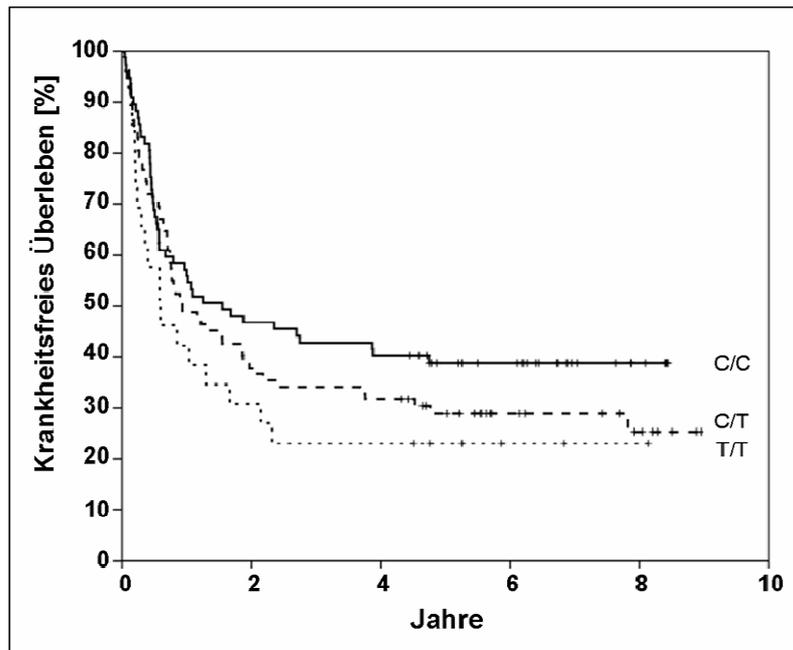


Abbildung 36:Kaplan-Meier Schätzungen der Gesamtüberlebensrate in AML Patienten im Verhältnis zu den Genotypen des CDA SNP C-451T.

(n = 360, (Mahlknecht, *et al* 2009))

Die Unterschiede im 5 Jahre krankheitsfreiem Überleben (T\_T 23 % vs C\_C 39 %) waren dabei nicht signifikant ( $p = 0,08$ ) (Abbildung 37). Die Werte der Patienten mit heterozygotem Genotyp lag bei Gesamtüberlebensrate und bei der krankheitsfreien Überlebensrate zwischen den beiden homozygoten Genotypen mit 23 und 29 % (Mahlknecht, *et al* 2009).



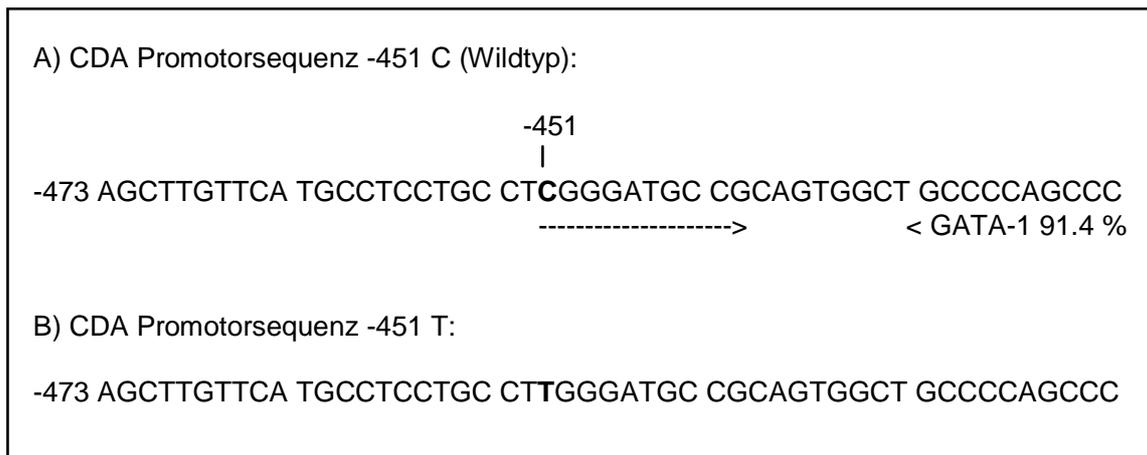
**Abbildung 37: Kaplan-Meier Schätzungen der krankheitsfreien Überlebensrate in AML Patienten im Verhältnis zu den Genotypen des CDA SNP C-451T.**  
(n = 185, (Mahlknecht, *et al* 2009))

Zur Bestätigung der Aussagekraft dieser Korrelationen wurde eine Multivarianz-Cox Analyse mit Einbeziehung von allen 3 CDA SNPs (A79C, A-92G, C-451T), zytogenetischen Risiken, WBC, Thrombozytenzahl, LDH, CD34 Expression, KM Blasten, FLT3/NMP1 Mutationsstatus, Alter und Krankheitsstatus durchgeführt. Diese statistischen Analysen zeigten, dass Patienten mit homozygot variantem (T\_T) Genotyp ein um über 50 % erhöhtes Todesrisiko im Vergleich zum wildtyp Genotyp (Hazard Ratio 1,56 (95 %-CI 1,09-2,24),  $p = 0,02$ ) hatten und bestätigten CDA SNP C-451T als einen unabhängigen prognostischen Überlebensfaktor. (Mahlknecht, *et al* 2009)

### 3.4.2.2 Identifikation putativer molekularer Basis des CDA SNP C-451T Effekts

Mit Hilfe einer *in silico* Analyse des CDA Promoters mittels dem Programm TF Search (2.10.3) zur Identifikation möglicher Transkriptionsfaktoren konnte an der Position des SNPs C-451T eine GATA-1 Bindestelle (91,4 %) aufgedeckt werden (Abbildung 38 A), wobei GATA-1 für eine Steigerung der CDA Transkription verantwortlich ist (Ge, *et al* 2004, Ge, *et al* 2005, Muntean, *et al* 2006).

Bei der vergleichenden Analyse mit der Sequenz mit der varianten Base (Thymin statt Cytosin) entfiel diese GATA-1 Bindestelle (Abbildung 38 B).



**Abbildung 38: Vergleich der in silico Analyse der CDA Promotorsequenz für C-451T.**

Ergebnisse der Transkriptionsfaktor Suche mittels TF Search mit Grenzwert 90 % Sequenzhomologie für Sequenz mit A) Wildtyp und B) varianter Base.

Neben der Identifikation des CDA SNPs C-451T als neuen prognostischen Marker konnte mit der Aufdeckung einer putativen veränderten GATA-1 Bindestelle eine mögliche Erklärung der Wirkung bzw. klinischen Relevanz des SNPs gegeben werden, welche durch einige Studien zur Ara-C Sensitivität und dem Einfluss der CDA Expression und Aktivität bekräftigt werden (4.4.3).

## 4 Diskussion

Epigenetische Therapien in Form von demethylierenden Substanzen und HDAC-Inhibitoren beeinflussen sowohl die globale Chromatinstruktur und Transkriptionsfähigkeit, als auch spezifische Genexpression/-en und Proteinfunktionen und -Stabilitäten und gehören zu den großen Hoffnungsträgern aktueller klinischer Forschung (Mahlknecht 2008 in (Ehninger, *et al* 2008a), wobei sie besonders in Kombinationstherapien viel versprechende synergistische Erfolge aufweisen (Bishton, *et al* 2007).

Neben soliden Tumoren werden epigenetische Therapien mit demethylierenden Substanzen und HDAC-Inhibitoren auch bei hämatologische Neoplasien eingesetzt, wo sie ganz besonders gute Therapieergebnisse und synergistische Effekte bei MDS und AML zeigen (Bishton, *et al* 2007). Wie auch bei der Standardtherapie mit Ara-C, treten auch bei HDAC-Inhibitor Therapien individuelle Unterschiede des Therapieansprechens und Nebenwirkungen (welche deutlich geringer sind, als die der Zytostatika) auf (1.4.1), weshalb weitere Therapieoptimierungen, mit dem Ziel geringerer Nebenwirkungen (Dosisanpassung, Verringerung eingesetzter Konzentrationen) bei gesteigerter Therapieeffizienz, nötig sind. Dabei zeigen zahlreiche Studien, dass neben anderen molekularen Markern und genetischen Aberrationen sowohl Genexpressionsveränderungen (am Beispiel von HDACs zusammengefasst in (Stimson and La Thangue 2009, Weichert 2009)) als auch das Auftreten bestimmter SNPs mit der Pathogenese, dem Verlauf und Therapieansprechen von Krebs in Zusammenhang stehen und für die Diagnose, Prognose relevant sind und zur Therapie-Optimierung in Richtung spezifischeren, individualisierteren Therapieformen herangezogen werden und entsprechend auch eine Grundlage für die Optimierung der HDAC-Inhibitor- und Ara-C Therapie darstellen.

In diesem Zusammenhang soll, neben der Auswertung der Ergebnisse, besonders die Bedeutung der im Rahmen dieser Arbeit erlangten (epigenetischen und pharmakogenomischen) Erkenntnisse durch die Genexpressionsanalysen von HDACs in AML-Subtypen und die SNP Analysen von HDACs (Dransfeld, *et al* 2007), speziell auch SIRT3 (mit den funktionellen Analysen) (Dransfeld, *et al*), sowie von Ara-C metabolisierenden Enzymen (Mahlknecht, *et al* 2009) hervorgehoben und im Folgenden erläutert und im Kontext der Literatur diskutiert werden.

## 4.1 AML-Subtypspezifische HDAC Genexpressionsanalysen

### 4.1.1 Wichtigkeit der Analysen

Bis heute ist AML bis auf wenige Ausnahmen (M3) bei der Mehrzahl der Erwachsenen eine unheilbare Krankheit mit sehr wenigen Langzeitüberlebenden bei Patienten über 60 Jahren und wird meist noch mit Standardtherapien behandelt. Neben der verbesserten Klassifizierung und Diagnostik sind neue gezieltere Therapien notwendig, um die Toxizität zu verringern und die Behandlungseffizienz zu erhöhen, was folgendes Zitat aus einem aktuellen Buch zu AML veranschaulicht und die Bedeutung der Ergebnisse der vorliegenden Arbeit hervorhebt:

*„Man kann davon ausgehen, dass die WHO-Klassifikation schon in naher Zukunft aufgrund neuer genetischer und insbesondere molekularbiologischer Erkenntnisse sowie durch die Ergebnisse von Genexpressionsanalysen ergänzt und modifiziert werden muss. Als Folge davon könnte die heute noch relativ gleichartige Chemotherapie der AML (Ausnahme APL (M3)1.2.4) eine entsprechend der Biologie differenzierte Vielfalt erfahren – natürlich mit dem Ziel verbesserter Behandlungsergebnisse.“* (Ehninger, et al 2008b)

Seitdem die Wissenschaft die Möglichkeiten der epigenetischen Behandlung entdeckt hat, fokussierte sie sich auf epigenetische Mechanismen bei Krebs, wobei neben Demethylierenden Substanzen speziell auch die Rolle von HDACs bei der Krebsentstehung, -Entwicklung und -Progression analysiert wurde und wird. Auch die klinische Forschung bei der AML konzentriert sich mehr und mehr auf individualisierte Therapien im Hinblick auf subtypspezifische Charakteristika und weil HDACs in entscheidende Schritte in zahlreichen aktuellen Modellen der Pathogenese von AML und Myelodysplastischen Syndromen (MDS) involviert sind (1.2.1.), wird besondere Anstrengung in die Erforschung und Verbesserung entsprechender Therapien mit HDAC-Inhibitoren (HDACi) unternommen.

Klinische Studien mit HDACi (als neue „Differenzierungstherapeutika“) weisen dabei sowohl bei der Therapie von akuten Leukämien, als auch bei der Behandlung solider Tumoren viel versprechende Ergebnisse auf, wobei neben zum Teil unklaren Funktionen und Verhalten epigenetischer Regulatoren in der Zelle auch die Langzeitwirkungen dieser neuen molekularen Therapiestrategien noch offen sind und die Euphorie durch unzureichende Spezifität und im Vergleich zu anderen anti-Krebstherapien zwar geringe, aber nicht unerhebliche Nebenwirkungen der Substanzen (vgl. 1.1.5) gehemmt wird ((Mahlknecht and Hoelzer 2003, Mei, et al 2004), Mahlknecht 2008 in (Ehninger, et al 2008a)).

Die sich hieraus ergebende Notwendigkeit weiterer HDACi-Therapieoptimierung wird unter anderem dadurch erschwert, dass unklar ist, welche Patienten oder AML Subgruppen am besten auf HDACi Therapie ansprechen, was zum einen auf fehlendem Wissen über Zusammenhänge zwischen HDACi Toxizität und ihrer pharmakodynamischen und pharmakokinetischen Eigenschaften (die noch zum Großteil unbekannt sind) und zum anderen auch auf den starken Variationen der HDAC Expressionslevel in den Patienten beruht (Minucci and Pelicci 2006), was wiederum auf Expressionsunterschieden der AML-Subtypen beruhen könnte. Während die Heterogenität der Subgruppen der AML im Hinblick auf eine zielgerichtete patientenspezifische Therapie in Zusammenhang mit demethylierenden Substanzen in jüngsten Studien in Cancer Cell von Figueroa et al. 2010 berücksichtigt wurde und zur Identifizierung von AML-Subtypischen DNA Methylierungsmustern führte (Figueroa, *et al*), war bisher noch nichts zu charakteristischen AML-Subtypspezifischen HDAC Expressionsmustern bekannt, welche ebenfalls kritische Parameter darstellen und wesentlichen Einfluss auf HDAC Inhibitor-Therapieansprechen haben könnten.

Genau an diesem Punkt setzten die Analysen der vorliegenden Arbeit an, in dem die AML-Subtypspezifischen HDAC Expressionsmuster analysiert und aufgedeckt wurden, mit dem Ziel weitere Anhaltspunkte bzw. Grundlagen für eine Optimierung der HDACi Therapie durch eine an die HDAC Expressionslevel angepasste, individualisierte HDACi Behandlung der AML Patienten mit reduzierten Nebenwirkungen zu ermöglichen. In diesem Zusammenhang hob ein aktueller Review über HDAC Expression und die klinische Prognose hervor, dass aktuelle Daten auf eine Rolle der veränderten HDAC Expression in humanen Tumoren hindeuten und dass künftige Studien klären müssen, ob HDAC Expressionsmuster eine Vorhersage der Wirkung von bzw. Antwort auf HDACi Behandlung erlauben (Weichert 2009).

In letzter Zeit wurden neben der vorliegenden Arbeit auch eine Anzahl von umfangreichen translationale Expressionsstudien zu HDACs in anderen Tumoren, mit signifikanten Korrelationen zur Prognose, publiziert (zusammengefasst in (Weichert 2009)), in deren Kontext die Daten der vorliegenden Arbeit im Folgenden eingearbeitet (Tabelle 18) und diskutiert werden. Die meisten dieser Studien konzentrierten sich auf Klasse I HDACs, wohingegen sich relativ wenige mit Klasse II und fast keine sich mit Klasse III HDACs beschäftigten.

Dies hebt zusätzlich zu den beschriebenen entscheidenden Funktionen von HDACs in der Pathogenese von AML und der Hoffnung auf innovative epigenetische Strategien in diesem Kontext (Mahlknecht and Hoelzer 2000, Mei, *et al* 2004) und der Entdeckung, dass AML im Allgemeinen eine Expressionsveränderung der HDACs aufweist (Bradbury, *et al* 2005), die

Wichtigkeit der Analyse von AML-Subtypischen HDAC Expressionsmustern, inklusive von Mitgliedern der Klasse III HDACs, hervor.

#### **4.1.2 Identifikation von AML M1 als Subtyp mit signifikant höheren HDAC Expressionsleveln – möglicher Einfluss auf HDACi-Therapie?**

Die Aufdeckung der spezifischen HDAC Expressionsmuster in den unterschiedlichen AML-Subtypen bzw. speziell die Identifikation von AML M1 als Subtyp mit signifikant höheren HDAC Expressionsleveln gegenüber allen anderen analysierten Subtypen durch die vorliegende Arbeit, bietet eine unabdingbare Basis für weitere Verbesserungen bei der HDACi Therapie bei AML, indem sie die Grundlage für eine Anpassung der HDAC Inhibitor dosis an die Expressionslevel liefert und z.B. die Möglichkeit eröffnet diese in AML M1 mit besonders stark erhöhten Expressionsleveln zu erhöhen und / oder sie in den anderen Subtypen mit geringere Expressionshöhe zu reduzieren, was auch bei der Entwicklung von HDAC-Inhibitorcocktails berücksichtigt werden sollte (Abbildung 41). Aufgrund der besonders starken Ausprägung der HDAC Expressionsveränderungen ist der Subtyp M1 besonders geeignet für die Analyse von neuen HDAC Inhibitorcocktails, die sich aus der identifizierten HDAC Expressionsmustern ergeben könnten (4.1.5, 4.1.5.4).

Dabei muss die klinische Anwendbarkeit der Ausprägung der Unterschiede in den Expressionsveränderungen in klinischen Studien geprüft werden.

#### **4.1.3 Ausschluss putativer Einflüsse anderer Korrelationen auf identifizierte AML-Subtypspezifische HDAC Expressionsmuster**

Nach der Identifikation von AML M1, als Subtyp mit im Vergleich zu den anderen analysierten Subtypen signifikant stärker erhöhten HDAC Expressionswerten, wurden Korrelationsanalysen zu unterschiedlichen Parametern, welche einen möglichen Einfluss auf die Korrelation zwischen HDAC Expression und AML-Subtypen aufdecken sollten, durchgeführt (um die Aussagekraft zu validieren).

Alle in diesem Zusammenhang unter 3.1 dargestellten Ergebnisse (der Korrelationsanalysen) sprechen aufgrund der meist fehlenden signifikanten Unterschiede und / oder den dargelegten gegensätzlichen Tendenzen gegen einen Einfluss der aufgeführten identifizierten weiteren Korrelationen (der HDAC Expressionen und Subtypen mit anderen Parametern) auf die Identifikation von AML M1 als Subtyp mit signifikant stärker erhöhten HDAC Expressionswerten, was auch durch entsprechende Multivarianzanalysen bestätigt wurde.

Bevor auf diese Zusammenhänge und Kontrollanalysen eingegangen wird, soll noch die Verwendung von PBMCs als verwendete Vergleichsreferenz diskutiert werden.

#### 4.1.3.1 Korrelation AML-Subtypen mit Blastengehalt - PBMCs sind ausreichend genaue Vergleichsreferenz

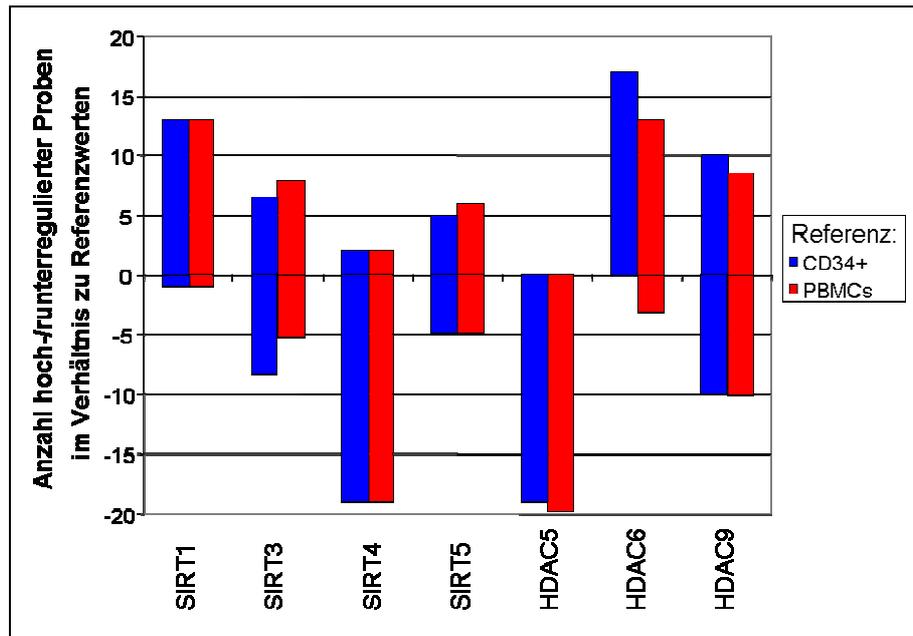
Bei der zu Grunde liegenden Studie (2.6) aus der die analysierten Proben stammen, wurden die Zellen, wie bei entsprechenden Studien üblich, nicht sortiert, sondern Ficollisolationen der Leukozytenfraktion durchgeführt und entsprechend RNA aus PBMCs und nicht nur aus Blasten (CD34+) gesammelt. Da sich der Blastenanteil zwischen gesunden Probanden und AML Patienten, als auch unter den AML Patienten untereinander unterscheidet, kann dies einen Einfluss auf die erhobenen Daten haben und wurde in die kritische Analyse der Ergebnisse aufgenommen.

Zum einen zeigten die Korrelationsanalysen, als auch die entsprechenden Multivarianzanalysen (3.1.2), dass die ermittelten Korrelationen trotz Einbeziehung der unterschiedlichen Blastenkonzentrationen signifikant bleiben. Zum anderen ist hervorzuheben, dass wir das Ziel hatten Unterschiede zwischen den AML-Subtypen zu identifizieren und es entsprechend nur auf einen festen, gleichen Bezugspunkt ankam, der durch die Durchschnittswerte der Genexpressionsanalysen der DNA von PBMCs gesunder Probanden festgelegt wurde.

Obwohl unsere Analysen also in ihrer Zielsetzung keinen Anspruch auf einen quantitativ hundert Prozent korrekten Bezugswert hatten, zeigten in Ergänzung zu den durchgeführten Korrelations- und Multivarianzanalysen bereits frühere Analysen, dass der Vergleich von PBMCs gesunder gegenüber PBMCs von AML Patienten durchaus als ausreichend genaue Kontrolle angesehen werden kann, da sich kein signifikanter Unterschied gegenüber Analysen mit reinen KM Blasten zeigte (Bradbury, *et al* 2005) (Abbildung 39).

Aus den Analysen von Bradbury et al. 2005 ging hervor, dass der Vergleich der PBMCs und CD34+ Zellen (Blasten) keine Unterschiede in der Tendenz der HDAC Expressionsveränderungen zeigte. Dabei wurde jedoch nicht auf etwaige Unterschiede in der Ausprägung der Expressionsänderungen eingegangen.

Um einen Einfluss der unterschiedlichen Anteile an Blasten bei den AML-Subtypen auf die identifizierten AML-Subtypspezifischen HDAC Expressionsveränderungen ganz auszuschließen, wurden aus diesem Grund bei unserer Studie u.a. ebenfalls Korrelationsanalysen des Blastengehalts (CD34+) mit der HDAC Expression und den AML-Subtypen (sowie allen anderen Korrelationen) durchgeführt.



**Abbildung 39: Frequenz der hoch- oder runterregulierten HDAC Expression in AML Zellen in Relation zu zwei unterschiedlichen Zellpopulationen.**

Bradbury et al. 2005 zeigten, dass es keinen signifikanten Unterschied bei der Analyse der HDAC Expressionsveränderungen in AML Zellen gibt, wenn man als Referenz entweder PBMCs oder CD34+ (MPBs) verwendet. Es wurden beispielhaft die Ergebnisse von Bradbury et al. 2005 für die von uns analysierten HDACs im Vergleich mit den unterschiedlichen Referenzen dargestellt.

Da sich im Gegensatz zu den Korrelationen der HDAC Expression mit AML-Subtypen, wo nur der Subtyp M1 deutlich höhere Expressionslevel aufzeigte und die anderen Subtypen sehr ähnliche Werte aufwiesen, bei der Verteilung des Blastengehalts deutliche Unterschiede zwischen allen AML-Subtypen zeigten, war eine verfälschende Beeinflussung der Korrelationen der HDAC Expression mit den Subtypen aufgrund den Blastengehalt unwahrscheinlich, was durch die entsprechende statistische Korrelationsanalysen der HDAC Expression mit CD34+ Gehalt, als auch durch eine entsprechende statistische Multivarianzanalyse (HDAC Expression, AML-Subtypen und CD34+ Zellen) bestätigt werden konnte.

#### 4.1.3.2 Korrelation HDAC Expressionsmuster mit zytogenetischen Aberrationen

Die Multivarianzanalysen, sowie die vergleichenden Analysen, der Korrelationen zwischen HDAC Expressionsleveln mit zytogenetischen Aberrationen und deren Verteilung in AML-Subtypen zur Überprüfung eines möglichen Einflusses auf die Signifikanz der AML-Subtypspezifischen HDAC Expressionsleveln zeigten, dass die Identifikation des AML-Subtyps M1 auch in diesem Kontext nichts an Signifikanz einbüsst.

Dass die Verteilung der zytogenetischen Aberrationen in den AML-Subtypen keinen Einfluss auf die Signifikanz der subtypspezifischen HDAC Expression hat, zeigt sich dadurch, dass die HDAC Expressionen mit den gleichen zytogenetischen Aberrationen bei AML M1 signifikant

stärkere Expressionssteigerungen zeigen, als bei AML M5a (3.1.3), was darauf hinweist, dass bei AML M1 noch andere Faktoren vorhanden sind, die für diese zusätzliche Expressionssteigerung verantwortlich sind. Es konnten also nicht nur signifikante Korrelationen zwischen HDAC Expression mit bestimmten AML-Subtypen, als auch mit bestimmten zytogenetischen Aberrationen identifiziert werden, sondern weiterhin gezeigt werden, dass bei gleichen zytogenetischen Aberrationen die Expressionen in AML M1 signifikant höher gesteigert sind.

Im Zusammenhang mit den zytogenetischen Aberrationen ist auch das Fehlen einer Korrelation der HDAC Expressionen mit Überleben zu erwähnen. Während bei manchen Tumoren schon Korrelationen der HDAC Expressionen mit Überleben aufgezeigt wurden (4.1.5), traten bei den vorliegenden Analysen keine Korrelationen der AML-Subtypspezifischen HDAC Expressionen mit Überleben auf. Dies könnte zum einen darin begründet sein, dass in der AML96 Studie (aus der die Proben stammen) noch keine HDACis eingesetzt wurden und sich somit keine Korrelationen mit Überleben aufgrund direkter Effekte, sondern nur aufgrund von indirekten Effekten (4.1.5.3) der HDAC Expression auf die AML Therapie ergeben konnten. Zum anderen könnte es daran liegen, dass bei AML besonders das Vorkommen von zytogenetischen Aberrationen Einfluss auf die Prognose und Überleben hat und dass die HDAC Expressionslevel sich bei zytogenetischen Aberrationen mit positiver und negativer Prognose nicht signifikant unterschieden, sondern signifikante Expressionsunterschiede bei AML mit Standardrisiko aufzeigten, was darauf hindeutet, dass bei fehlendem HDACi Einsatz der Einfluss der zytogenetischen Aberrationen und anderen z.T. noch unbekanntem Faktoren überwiegt. Weiterhin könnte das Level bzw. die Ausprägung der HDAC Expressionsunterschiede nicht ausreichend sein, um ohne HDACi Einsatz signifikanten Einfluss auf die Überlebensrate zu zeigen.

#### **4.1.3.3 Korrelation HDAC Expressionsmuster mit Karyotyp**

Während die Korrelationen mit zytogenetischen Aberrationen die stärksten HDAC Expressionssteigerungen bei AML mit Standardrisiko aufzeigten, ergaben sich bei der Korrelation mit dem Karyotyp entsprechend die stärksten HDAC Expressionssteigerungen bei AML mit normalem Karyotyp, was erstere Analysen unterstützt. Da der normale Karyotyp vergleichbar ist mit der Gruppe von AML mit Standardrisiko ohne die Aberrationen, (die keinen Effekt auf die Prognose haben,) könnte man des Weiteren folgern, dass speziell die AML ohne Aberrationen gesteigerte HDAC Expressionslevel haben. Während also HDACs in den meisten AML mit zytogenetischen Aberrationen aufgrund von Fehlregulierung in Korepressokomplexen

verstärkt aktiv sind, werden sie in AML ohne zytogenetische Aberrationen verstärkt exprimiert, was wiederum die Bedeutung der HDACs in der Pathogenese von AML hervorhebt.

#### 4.1.4 Aufdeckung weitere Korrelationen

##### 4.1.4.1 Korrelation HDAC Expressionsmuster mit unerwünschten Nebenwirkungen

Im Zusammenhang der Korrelation geringerer SIRT1 Expressionssteigerungen mit Antithrombin (ATIII), wäre eine über den Acetylierungsgrad beeinflusste Regulation der Antithrombin Expression oder und Proteinfunktion denkbar; wobei bekannt ist, dass die (konstitutive) Expression des humanen Antithrombin Gens vom Zusammenspiel aktivierender (C/EBP $\alpha$  (CCAAT enhancer-binding protein), HNF4 (hepatocyte nuclear factor 4)) und hemmender (TR $\alpha$  (thyroid hormone receptor  $\alpha$ ), HNF3) Transkriptionsfaktoren abhängt. Da für einige dieser Transkriptionsfaktoren ebenfalls eine Regulation durch HDACs bekannt ist, wie z.B. für HNF4 (Yamashita, *et al* 2003) und C/EBP $\alpha$  (Zuo, *et al* 2006), welche die Antithrombin Expression aktivieren und durch über HDACs gehemmt werden, ist ein aktivierender Einfluss der geringeren HDAC bzw. SIRT1 Expressionsstärke auf die Antithrombin Konzentration zu erklären.

Für die Korrelationen der gesteigerten HDAC6 Expression mit verstärktem Auftreten von Proteinurie sind in der Literatur bisher noch keinen direkten Studien bzw. Zusammenhänge bekannt, aber aufgrund der bekannten Funktionen von HDACs können folgende putativen Zusammenhänge bzw. Ursachen aufgeführt werden:

Im Zusammenhang mit Proteinurie ist bekannt, dass Diabetes ein Risikofaktor ist und dazu führen kann, dass die Nephronen geschädigt sind und sich eine Proteinurie ausbilden kann. Weiterhin ist bekannt, dass Modifikationen des Histon Acetylierungsgrads die Chromatin regulierte Insulin Transkription beeinflussen können und es gibt immer mehr Hinweise einer Verbindung dieser Mechanismen mit der Pathogenese von Diabetes (Gray and De Meyts 2005, Lawless, *et al* 2009). Speziell für SIRT1 und 4 (4.1.5.2) sind Beeinflussungen der Insulinsensitivität nachgewiesen (Haigis, *et al* 2006, Stolzenberg-Solomon, *et al* 2005, Yoshizaki, *et al* 2009). In diesem Kontext könnte die erhöhte HDAC Expression entsprechend (über Veränderung des Acetylierungsgrads die Chromatin regulierte Insulin Transkription einen negativen Einfluss auf die Nephronen haben und) die Entstehung einer Proteinurie begünstigen, was eine mögliche Erklärung dieser Korrelation sein könnte.

#### **4.1.4.2 Korrelation HDAC Expressionsmuster mit kompletter Remission und Rezidiv Auftreten**

Obwohl die analysierten AML Patienten in der Studie keine HDAC-Inhibitor Therapie erhielten, konnten statistisch signifikante Korrelationen gesteigerter HDAC Expressionen mit gesteigerter kompletter Remission (besonders nach Induktionstherapie 2) aufgedeckt werden (3.1.6), welche mit den zellulären Konsequenzen der HDAC Expressionsveränderungen in den AML Zellen (4.1.5) und entsprechenden Korrelationen in anderen Tumoren mit Tumorinvasivität und Tumorangiogenese (Ashraf, *et al* 2006, Bradbury, *et al* 2005, Lee, *et al* 2008, Marquard, *et al* 2008, Osada, *et al* 2004, Saji, *et al* 2005, Yang, *et al* 2008) erklärt werden können, welche im Detail unter (4.1.5) aufgeführt, zusammengefasst (Tabelle 18) und diskutiert werden. Unter 4.1.5.1.2 wird auch die „doppelte“ Korrelation von gesteigerter HDAC6 Expression mit kompletter Remission (3.1.6), als auch mit verstärktem Rezidivauftreten (3.1.6) diskutiert.

#### **4.1.5 Identifizierte HDACs mit Expressionsveränderungen im Kontext physiologischer Funktionen und onkogenem Potential – was sind AML relevante Ziele?**

Die vorliegenden Ergebnisse der Genexpressionsveränderungen der HDACs in AML ohne Differenzierung der Subtypen können mit den Tendenzen (des kleinen Probenpools) von Bradbury *et al.* 2005 verglichen werden, welche allerdings keine Aussagen über das Ausmaß der Expressionsveränderungen lieferte, und bestätigen diese, bis auf HDAC5 und HDAC9. Während HDAC5 nur verringerte Expression und HDAC9 sowohl verringerte, als auch gesteigerte Expression in der Studie von Bradbury *et al.* 2005 zeigte, ergab die vorliegende Arbeit für HDAC5 nicht nur verringerte, sondern auch gesteigerte Expressionen und für HDAC9 nur gesteigerte Expressionslevel (mit starker Ausprägung). Da das Probenkollektiv der vorliegenden Studie fast drei mal so groß ist, wie das der Studie von Bradbury *et al.* 2005, sind die Daten dieser Studie statistisch signifikanter und ist es wahrscheinlich, dass in der damaligen Studie entsprechende Fälle nicht erfasst wurden.

Um die Bedeutung, Auswirkungen und möglichen Folgen dieser identifizierten HDAC Expressionsänderungen, sowie daraus ableitbare therapeutische Möglichkeiten zu offenbaren, werden im Folgenden die einzelnen HDACs, die in ihrer Expression in AML verändert waren, im Kontext ihrer bekannten onkogenen Potentiale (Korrelationen in anderen Tumoren) im Einzelnen (4.1.5.1, 4.1.5.2) und in ihrer Gesamtheit (4.1.5.3) und soweit bekannt mit ihren physiologischen Funktionen diskutiert.

#### 4.1.5.1 Klasse II HDACs mit veränderter Expression in AML

Obwohl der Fokus bisheriger Studien auf Korrelationsanalysen von Klasse I HDACs lag, sind auch für Klasse II HDACs einige Korrelationen zwischen veränderter Expression und Tumoren bekannt.

Klasse I HDACs wurden in den vorliegenden Analysen nicht berücksichtigt, da sie keine Genexpressionsveränderungen in AML aufweisen (Bradbury, *et al* 2005), was darauf hindeutet, dass das onkogene Potential von Klasse I HDACs bzw. ihre Beteiligung an der Pathogenese von AML hauptsächlich auf der Fehlregulierung durch Rekrutierung in Korepressorkomplexen basiert.

##### 4.1.5.1.1 HDAC5

Die Feststellung, dass höhere HDAC5 Expression mit kompletter Remission (nach Induktionstherapie II) bei AML korreliert, wird durch Ergebnisse von Studien bei Lungenkrebs unterstützt, in denen eine reduzierte HDAC5 Expression hoch signifikant ( $P = 0,0006$ ) mit schlechterer Prognose korrelierte und HDAC5 als unabhängiger Marker für Kurzzeitüberleben hervorgehoben wurde (Osada, *et al* 2004). In der Studie von Osada *et al.* 2004 wurden neben HDAC5 auch die anderen Mitglieder der Klasse II HDACs mit der Störung der Regulation der Differenzierung und Proliferation von Lungenepithelzellen und Krebsentstehung (über Transkriptionsfaktoren, die durch verringerte Expression von Klasse II HDACs in ihrer Aktivität gesteigert werden,) in Verbindung gebracht.

Weiterhin wurden verringerte Expressionen in Nieren- und Blasen Tumoren und eine gesteigerte HDAC5 Expression in kolorektalen Tumoren aufgezeigt (Ozdag, *et al* 2006).

Zur Funktion von HDAC5 ist bekannt, dass es mit dem Transkriptionsfaktor GATA-1 interagiert und eine Funktion bei der erythroiden Differenzierung spielen könnte (Watanoto, *et al* 2003).

Die Veränderungen von HDAC5 waren bei unseren Analysen zum einen nicht besonders ausgeprägt und zum anderen traten sowohl gesteigerte, als auch verringerte Expressionen auf, was unter anderem auch ein Grund sein könnte, dass keine weiteren signifikanten Korrelationen auftraten.

##### 4.1.5.1.2 HDAC6

Besonders interessant ist die in den AML Zellen identifizierte Expressionssteigerung von HDAC6 (speziell in AML M1 und AML mit Standardrisiko), da vorherige Studien eine signifikante Verbindung zwischen Prognose und HDAC6 Expression in verschiedenen Tumoren, speziell auch in hämatologischen Krankheiten nachweisen konnten, in dem gezeigt wurde,

dass eine erhöhte HDAC6 Expression mit erhöhten Überlebenszeiten korrelierte und zwar unabhängig von der Tumoraggressivität in kutanen T-Zell-Lymphomen (CTCL) (Marquard, *et al* 2008), der ersten Tumorart für die HDACis zur Therapie zugelassen wurden (Marks and Breslow 2007, Marquard, *et al* 2008, Weichert 2009).

Weiterhin wurden Veränderungen der HDAC6 Expression in Lungenkarzinomen (Osada, *et al* 2004) und Östrogenrezeptor-positivem Brustkrebs (Saji, *et al* 2005, Zhang, *et al* 2004) nachgewiesen, wobei höhere HDAC6 Expressionen in kleineren Tumoren und geringeren histologischen Schweregraden auftraten und gesteigerte HDAC6 Expression immer signifikant mit verbesserter Prognose und Überleben korrelierte.

In diesem Kontext war die HDAC6 Expressionssteigerung in den AML Zellen ein viel versprechender Kandidat im Hinblick auf Korrelationen mit Prognose und Überleben, wobei unsere Korrelationsergebnisse zwar eine signifikante Korrelation zu gesteigerter kompletter Remission (besonders nach IT2) zeigten, aber auch eine signifikante Korrelation zu Rezidivaufreten und keine Korrelation zu Überleben ergaben.

Eine mögliche Erklärung für die Korrelation mit kompletter Remission, (in unserem Fall besonders nach IT2) (obwohl im Rahmen dieser Studie noch keine HDACi eingesetzt wurden) könnte darin bestehen, dass HDAC6 ein positiver Regulator der Zellzyklusprogression ist (Wickstrom, *et al* 2009), was die Zellen besonders anfällig macht für zytostatische AML Therapien, wie Daunorubizin und Ara-C, welche durch Einbau in die DNA während der Replikation Zellzyklustopp und Apoptose induziert (vgl. 1.2.5.2).

Die zusätzliche Korrelation von HDAC6 mit stärkerem Rezidivaufreten kann zumindest zum Teil dadurch erklärt werden, dass HDAC6 die erste Histon-Deacetylase war, die als einzelne HDAC für die onkogene Transformation und Tumorbildung nötig ist (Lee, *et al* 2008).

Folglich lassen sich somit sowohl die Korrelationen der gesteigerten HDAC Expression mit gesteigertem Rezidivaufreten, welche im Zusammenhang steht mit der durch HDAC6 induzierten onkogenen Transformation und Tumorbildung, als auch die Korrelation mit besserem Ansprechen auf Zytostatikatherapie (besonders IT2), durch die aufgrund der Stimulierung des Zellzyklus gesteigerten Anfälligkeit für den Einbau in die DNA während der Replikation, erklären.

Demgegenüber offenbarte die Analyse (einer Untergruppe bestehend aus) Östrogenrezeptor positiver Brustkrebspatienten, welche mit dem Östrogenrezeptor-Antagonisten Tamoxifen behandelt wurden, eine Korrelation von HDAC6 Expression mit gesteigerter Rezidiv-freier Zeit und Gesamtüberleben, wobei HDAC6 als unabhängiger prognostischer Faktor identifiziert wurde, wobei die zu der Korrelation bei AML Patienten gegenläufige Korrelation einer

verringerten Rezidivrate bei gesteigerter HDAC6 Expression bei östrogenpositiven Brustkrebspatienten wohl auf Interaktion von HDAC6 mit dem Östrogenrezeptor basiert. So konnte gezeigt werden, dass HDAC6 ein Östrogen reguliertes Gen ist (Östrogen stimuliert HDAC6 Expression) und dass Tamoxifen die HDAC6 induzierte Deacetylierung von Tubulin (s.f.) und die damit verbundene Erhöhung der Motilität verhindert (Saji, *et al* 2005), was eine Erklärung für geringeres Rezidivaufreten bei dieser speziellen Patientengruppe sein könnte.

Die Deacetylierung von  $\alpha$ -Tubulin, welche zur Destabilisierung von dynamischen Mikrotubuli (Matsuyama, *et al* 2002) und gesteigerter Motilität und Migration führt, ist eine wichtige Funktion von HDAC6 (Haggarty, *et al* 2003, Parmigiani, *et al* 2008, Saji, *et al* 2005) (Abbildung 40, Abbildung 41). In diesem Kontext wurde auch eine Beteiligung von HDAC6 an der Metastasierung von Lungenkrebs (*in vitro*) über Beeinflussung der TGF- $\beta$  SMAD3 Kaskade nachgewiesen (Shan, *et al* 2008).

Im Zusammenhang mit Brustkrebs wurde gesteigerte HDAC6 Expression, die besonders ausgeprägt in östrogen- und Progesteronrezeptor-positiven Tumoren auftrat, mit verbessertem Ansprechen auf endokrine Behandlung korreliert, weshalb HDAC6 auch als prognostischer Indikator für Ansprechen auf endokrine Behandlung und für Brustkrebsprogression angesehen wird (Zhang, *et al* 2004).

HDAC6 spielt ebenfalls bei der Tumorangioese eine Rolle, da es die transkriptionale Aktivität von HIF-1 $\alpha$ , welcher die Transkription von in die Tumorangioese involvierten Genen anschaltet, reguliert bzw. aktiviert und durch direkte Interaktion den Abbau von HIF-1 $\alpha$  hemmt und somit die Tumorangioese fördert (Qian, *et al* 2006a) (Abbildung 40, Abbildung 41). Außerdem führt HDAC6 Knockout zu Abbau von VEGFR1 und 2 und könnte auch über HSP vermittelten proteosomalen Abbau von VEGFRs an der Angioese beteiligt sein (Park, *et al* 2008).

In diesem Zusammenhang ist eine weitere wichtige Funktion von HDAC6 hervorzuheben, die in der Deacetylierung und Aktivierung der Chaperonfunktion von Hsp90 besteht, dessen Inaktivierung durch HDCA6 Inhibierung zum Abbau von Wachstumsfördernden und Überlebensfördernden Proteinen wie Bcr-Abl Onkoproteinen, als auch Rezeptor Tyrosinkinasen (FLT3) in leukämischen Zellen (K562) führt (Bali, *et al* 2005, Whitesell and Lindquist 2005) (Abbildung 40, Abbildung 41). In diesem Zusammenhang ist ein besonderer synergistischer Therapieerfolg zu erwarten bei Kombination von HDAC (6) Inhibitoren mit FLT3 Inhibitoren bei Tumoren, die durch amplifizierte oder mutierte Tyrosin Kinasen angetrieben werden, wie es bei vielen (30-35 % (Gilliland and Griffin 2002)) AML Patienten (schlechte Prognose) der Fall ist (Lane and Chabner 2009, Whitesell and Lindquist 2005).

HDAC6 ist außerdem eine spezifische Deacetylase von Peroxiredoxinen und darüber an der Regulation des Redox-Zustands der Zelle beteiligt, indem es Peroxiredoxine (Prx I und II) über Deacetylierung inhibiert und somit deren antioxidative Wirkung hemmt (Parmigiani, *et al* 2008) (Abbildung 40, Abbildung 41). Obwohl HDAC6 in diesem Fall die antioxidative Abwehr zu schwächen scheint, wurde ebenso gezeigt, dass HDAC6 knockout dazu führt, dass die Zellen sich nicht von oxidativem Stress erholen (Kwon, *et al* 2007).

Weiterhin bindet und führt HDAC6 poly-ubiquitylierte fehlgefaltete Proteine zu Aggresomen (Kawaguchi, *et al* 2003) und eine Hemmung von HDAC6 macht Zellen entsprechend sensibler für Stress durch fehlgefaltete Proteine bzw. toxische Mikroaggregate in der Zelle, was zum Zelltod führen kann (Hideshima, *et al* 2005).

Entsprechend der beschriebenen HDAC6 Funktionen haben HDAC6 knockout Mäuse in vielen Organen hyperacetyliertes Tubulin, gesteigerte Acetylierung und verminderte Aktivität von Hsp90 (Zhang, *et al* 2008) und erholen sich nicht von oxidativem Stress (Kwon, *et al* 2007) und es ist nicht verwunderlich, dass HDAC6 die erste spezifische Histon-Deacetylase ist, die als einzelne HDAC für eine effiziente onkogene Transformation und Tumorbildung nötig ist (Lee, *et al* 2008). Die herausragende Rolle von HDAC6 in Zusammenhang der Tumorbildung und speziell mit Veränderungen in zellulären Vorgängen in AML Zellen (im Vergleich zu den anderen HDACs mit identifizierten charakteristischen Genexpressionsveränderungen in AML Zellen) wird in den zusammenfassenden Übersichten (Abbildung 40, Abbildung 41) und Tabellen (Tabelle 18) noch einmal besonders deutlich. Aufgrund der multiplen tumorrelevanten zellbiologischen Funktionen ist HDAC6 ein gutes Beispiel für die (zusätzlichen) HDAC-Effekte nicht epigenetischer Natur.

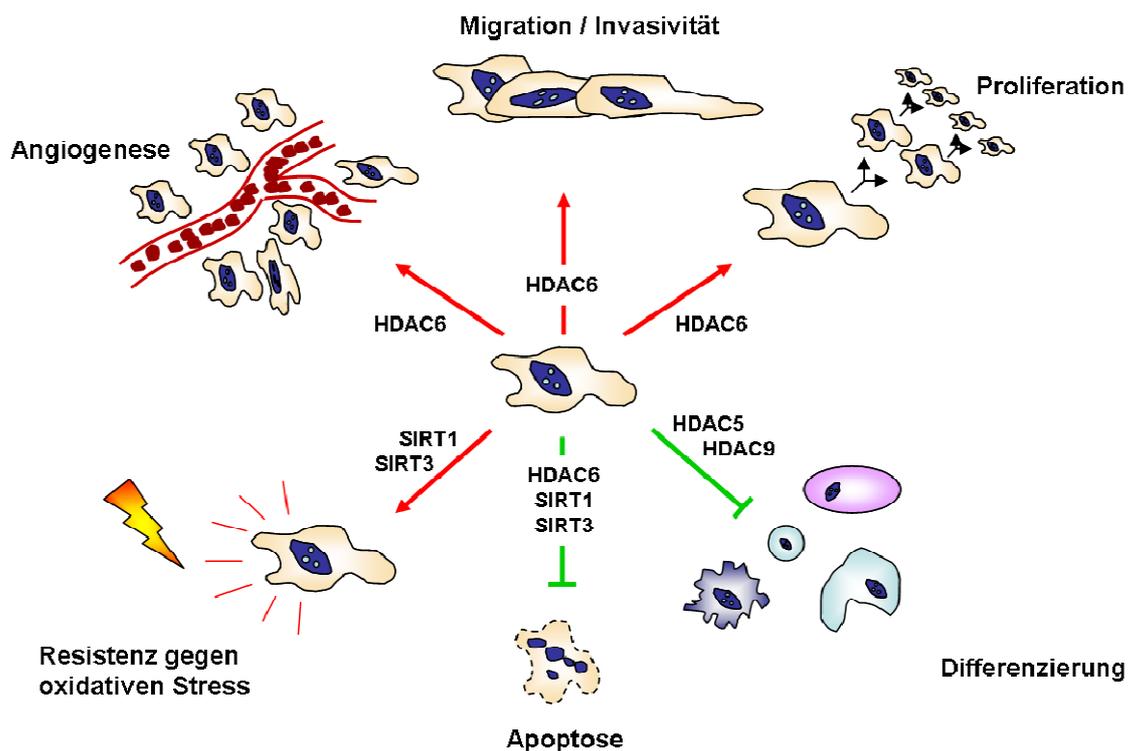
#### 4.1.5.1.3 HDAC9

Auch HDAC9 interagiert mit transkriptionalen Repressoren und Korepressoren, welche in die Pathogenese von hämatologischen Neoplasien involviert sind, wie z.B. N-CoR (Amann, *et al* 2001, Wang, *et al* 1998b) und es wurde entsprechend vorgeschlagen, dass HDAC9 an der Hämatopoese beteiligt sein könnte und dass seine Fehlregulierte Expression mit manchen Tumoren in Verbindung stehen könnte (Petrie, *et al* 2003). Dabei bindet HDAC9 an N-CoR, welches Teil eines Korepressorkomplexes mit mSin3 und HDAC1 ist und mit ETO in AML t(8;21) interagiert (Abbildung 40). Die t(8;21) Translokation zwischen AML1 und ETO tritt in 12% der AML auf und stellt damit die zweithäufigste genetische Veränderung der AML dar (Look 1997). Interessanterweise zeigten unsere Ergebnisse, dass t(8;21) die geringsten HDAC9 Expressionssteigerungen aller analysierten Gruppen zytogenetischer Aberrationen aufwies. Dies könnte damit erklärt werden, dass die verstärkte Interaktion von HDAC9 im

Korepressorkomplex eventuell eine stabilisierende Wirkung ausüben könnte, was aufgrund einer negativen feedback Regulation (HDAC9 hemmt eigene Expression (Haberland, *et al* 2007)) zu einer geringeren HDAC9 Expression führen könnte.

Im Zusammenhang mit den unterschiedlichen Korrelationsanalysen war bei der Korrelation der HDAC9 Expression mit AML M2 eine ähnliche Korrelation zu erwarten, wie bei Korrelation mit Zytogenetik, d.h. geringere Expression, da t(8;21) meistens bei AML M2 auftritt (nach der French-American-British (FAB) Klassifikation in ca. einem Drittel karyotypisch abnormaler M2), was sich bei den vorliegenden Analysen auch zeigte (mit leicht signifikant niedrigerer Expression gegenüber anderen Subtypen).

Da HDAC9 trotz der so extrem stark ausgeprägten Expressionssteigerungen in AML Zellen keinen Einfluss auf Prognose und Überleben zeigte, deutet darauf hin, dass HDAC9 im Vergleich zu den anderen HDACs jedoch nur eine untergeordnete Rolle bzw. einen geringeren Einfluss hat.



**Abbildung 40: Einfluss der HDACs mit veränderter Expression in AML auf Tumorbilogie.**

Dargestellt sind die Auswirkungen der gesteigerten HDAC Expressionen auf Angiogenese, Migration, Proliferation, Differenzierung, Apoptose und Resistenz gegen oxidativen Stress. Aktivierender Effekt ist durch rote Pfeile, inhibierender Effekt durch grüne Balken dargestellt. (weitere Erläuterungen und Referenzen siehe 4.1.5, 4.1.5.3, eigene Abbildung).

#### 4.1.5.2 SIRTUINE mit veränderter Expression in AML

##### 4.1.5.2.1 SIRT1 und SIRT3

SIRT1 und SIRT3, welche in fast allen AML Proben hochreguliert waren, sind besonders interessant, da sie zusammen alle Zellkompartimente abdecken und u.a. zentrale Funktionen bei der Regulation der Apoptose, Stressantwort, und dem zellulären Energiestoffwechsel besitzen (1.1.3.2, (Dransfeld, *et al*)) und sich zum Teil dabei ergänzen und ähnliche Effekte (über unterschiedliche Pfade) haben (3.3.4.2)! Weiterhin sind von den Sirtuinen, welche allgemein schon mit Krebspathogenese in Verbindung gebracht wurden (Johnstone 2002, Marks, *et al* 2001a), Neumeister, *et al* 2002), speziell SIRT1 und SIRT3 (gesteigerte Expression) korreliert mit der Tumprogression bei Brustkrebs, wobei besonders SIRT3 Expression mit fortgeschrittener Metastasierung korrelierte, was schon zur Diskussion einer möglichen Nutzung von Sirtuin Expressionsmustern in Diagnostik und Prognostik führte (Ashraf, *et al* 2006).

In diesem Zusammenhang ist ebenfalls hervorzuheben, dass speziell das SIRT1 Proteinlevel nicht nur in AML Zellen konstitutiv hoch reguliert ist, sondern generell in Krebszellen und auch in vielen Krebszelllinien höher ist als in gesunden Zellen (Huffman, *et al* 2007, Stunkel, *et al* 2007) und es wurde gezeigt, dass SIRT1 auch als Krebs-spezifischer Überlebensfaktor fungieren kann (Ford, *et al* 2005). Es wird angenommen, dass abnormal hohe SIRT1 Level eine wichtige Rolle bei dem Überleben von Krebszellen spielen, indem SIRT1 Promotoren von Tumor Suppressor Genen stilllegt (wobei SIRT1 Inhibition dabei sogar die stillgelegten Gene reaktivieren kann, obwohl Promotor-Hypermethylierung erhalten bleibt) (Pruitt, *et al* 2006). Generell scheint SIRT1 das Zellüberleben und die Zellteilung zu stimulieren als Antwort auf Umwelt-Signale oder Signale zur terminalen Differenzierung (Cohen, *et al* 2004, Fulco, *et al* 2003). Auch SIRT3 wirkt stressinduziert antiapoptotisch über Deacetylierung von Ku70 (Sundaresan, *et al* 2008), wodurch die Interaktion von Ku70 mit Bax induziert wird, welche die Bax induzierte Apoptose blockiert.

Die Hochregulation in Krebszellen mit den beschriebenen Korrelationen und die beschriebenen protektiven Funktionen von SIRT1 und SIRT3 deuten darauf hin, dass ihre Überexpression auch in AML durch eine Steigerung des Energiemetabolismus bzw. ATP-Produktion, bei gleichzeitiger Verringerung der ROS Konzentration, sowie durch Inhibition der Apoptose (1.1.3.2), zu Überlebensvorteilen führt (da nachgewiesen wurde, dass (Überexpression von), wobei speziell SIRT3 (über verschiedene Mechanismen) die Abwehr von ROS steigert (Kim, *et al*, Schlicker, *et al* 2008, Shi, *et al* 2005) und Überexpression SIRT1 über Deacetylierung

zur Inhibition von p53- (Vaziri, *et al* 2001) und Forkhead- abhängiger Apoptose führt (Araki, *et al* 2004, Brunet, *et al* 2004, Motta, *et al* 2004.)

Zu dem positiven, steigernden Effekt von SIRT1 und SIRT3 auf die ROS-Abwehr sind mehrere Ursachen bekannt (1.1.3.5).

Speziell die Überexpression von SIRT1 und SIRT3 könnte entsprechend ein wichtiger Faktor bei der Überlebensfähigkeit von AML Zellen gegenüber toxischen oder differenzierungsinduzierenden Chemostatika sein, da die Überexpression von SIRT1 und speziell SIRT3 der abschwächenden Wirkung von HDAC6 auf die antioxidative Abwehr (siehe 4.1.5.1.2). entgegen wirkt und diese ausgleicht bzw. insgesamt eine Steigerung der antioxidativen Abwehr bewirkt (Abbildung 40, Abbildung 41). Die protektive Rolle von SIRT1, welche bei unseren Analysen neben HDAC9 die höchsten Expressionssteigerungen aufzeigte, wird anhand der Studie von Bradbury *et al.* 2005 verdeutlicht, da sie zeigten, dass AML Blasten mit den geringsten SIRT1 Leveln (bei ansonsten gleich hohen HDAC Expressionen) am sensitivsten waren für HDAC-inhibitor (VPA) induzierte Apoptose (Bradbury, *et al* 2005).

Die Zytostatikatherapie der AML beinhaltet auch Daunorubicin, welches neben Einbau in die DNA auch als ROS agiert und den ROS Stress in Tumorzellen erhöht, welcher über die durch SIRT1 und SIRT3 erhöhte ROS Abwehr gesenkt werden könnte, was wiederum für eine Einbeziehung von Sirt1 und 3 Inhibitoren in die AML HDAC-Inhibitortherapie spricht.

#### 4.1.5.2.2 SIRT4 und SIRT5

Über die ADP-Ribosyltransferasen SIRT4 und SIRT5, die einzigen mitochondrialen Sirtuine neben SIRT3, ist noch nicht viel bekannt.

SIRT4 zeigt keine Deacetylaseaktivität (North, *et al* 2003) und ribosyliert das metabolische Enzym Glutamat-Dehydrogenase (GDH), wodurch dessen Aktivität inhibiert wird, was wiederum die ATP Produktion reduziert, da die Glutamat-Dehydrogenase Glutamat in  $\alpha$ -Ketoglutarat umwandelt, welches für die ATP Produktion benötigt wird (Haigis, *et al* 2006, Kelly and Stanley 2001). Entsprechend wirkt SIRT4 antagonistisch zu SIRT3, so dass als Folge der starken Reduktion der SIRT4 Expression in AML Zellen die aktivierende Wirkung von SIRT3 auf den Energiemetabolismus (ATP Produktion) noch verstärkt wird.

In diesem Kontext könnte man die Korrelation von geringerem Abfall der SIRT4 Expression mit vermehrter kompletter Remission (nach IT2) zum Teil damit erklären, dass ein geringerer Abfall der SIRT4 Expression zu einer stärkeren antagonistischen Wirkung zu SIRT3 führen könnte und entsprechend eventuell etwas mehr der steigernden Wirkung auf den Energiemetabolismus entgegengewirkt werden könnte.

Zusammenhänge mit Tumoren sind für SIRT4 bisher nur bei Bauchspeicheldrüsenkrebs bekannt, wobei SIRT4 die Insulinsekretion hemmt und gezeigt wurde, dass höhere Insulinlevel mit erhöhtem Bauchspeicheldrüsenkrebsrisiko korrelieren (Haigis, *et al* 2006, Stolzenberg-Solomon, *et al* 2005).

SIRT5 ist wie SIRT3 ein mitochondriales Matrix Protein und deacetyliert und aktiviert die Carbonyl-Phosphat-Synthetase 1 (CPS1, mitochondriales Protein) (Nakagawa, *et al* 2009, Ogura, *et al*), welche wiederum den initialen Schritt des Harnstoffzyklus für die Ammoniak-Detoxifikation und Beseitigung (wichtig beim Fasten) katalysiert (Jackson, *et al* 1986).

Interessanterweise deacetyliert SIRT5 Cytochrom C, ein Protein des Intermembranraums mit zentralen Funktionen im oxidativen Metabolismus (Elektronentransfer von Komplex III zu IV) und Apoptose Induktion (Aktivierung Apoptosekaskade über Komplexbildung mit Apaf-1) (Schlicker, *et al* 2008). Dabei muss die physiologische Signifikanz noch geklärt werden.

Wie für SIRT3 wird auch für SIRT5 eine mögliche Deacetylierung von p53 diskutiert (Michishita, *et al* 2005), aber es gibt keine nachgewiesenen Korrelationen zwischen SIRT5 und Krebs. Aus diesem Grund und auch aufgrund der uneinheitlichen, d.h. sowohl leicht gesteigerten und reduzierten Expression, fällt SIRT5 bei der Diskussion möglicher Auswirkungen auf die Tumorbilogie und als Ziel neuer HDACi Therapien nicht ins Gewicht.

**Tabelle 18: Übersicht über HDAC Expressionsanalysen und Korrelationen mit Tumoren und AML (in der Literatur inklusive der Daten der vorliegenden Arbeit).**

CTCL = kutanes T-Zell Lymphom, LK = Lungenkrebs, BK Brustkrebs, BSP = Bauchspeicheldrüsenkrebs

HDAC	Expressions- veränderung	Tumor- art	Korrelation mit Tumor -Entwicklung, -Progression, -Prognose	Referenz
<b>HDAC5</b>	Abnahme Steigerung/ Abnahme	LK <b>AML</b>	unabhängiger Marker für Kurzzeitüberleben geringere Level korrelieren mit geringerer kompletter Remission	Osada et al. 2004 eigene Ergebnisse
<b>HDAC6</b>	Steigerung	CTCL	verbesserte Überlebenszeit unabhängig von Tumoraggressivität	Marquard, <i>et al</i> 2008
	Steigerung	LK	verbesserte Prognose / Überleben	Osada, <i>et al</i> 2004 Saji, <i>et al</i> 2005
	Steigerung besonders in Progesteron- Rezeptor-pos. Steigerung	BK <i>in vitro</i>	verbesserte Prognose / Überleben besseres Ansprechen endokriner Behandlung	Zhang, <i>et al.</i> 2004  Yang, et al 2008 Lee, et al 2008
	Steigerung	<b>AML</b>	verringerte Tumorzellinvasivität ( <i>in vitro</i> ) benötigt für effiziente onkogene Trans- formation und Tumorbildung Aktivierung der Tumorangio-genese gesteigerte komplette Remission nach IT2 gesteigertes Rezidivaufreten	Qian, <i>et al</i> 2006 eigene Ergebnisse
<b>HDAC9</b>	Steigerung	<b>AML</b>	keine	eigene Ergebnisse
<b>SIRT1</b>	Steigerung	BK	Korrelation mit Tumorprogression	Ashraf, <i>et al</i> 2006

	Steigerung	AML	gesteigertes Überleben toxischer oder differenzierungsinduzierender Substanzen (in vitro)	Bradbury et al. 2005
	Steigerung	<b>AML</b>	gesteigerte komplette Remission (besonders nach IT2)	eigene Ergebnisse
<b>SIRT3</b>	Steigerung	BK	mit fortgeschrittener Metastasierung	Ashraf, <i>et al</i> 2006
	Steigerung	<b>AML</b>	gesteigerte komplette Remission (besonders nach IT2)	eigene Ergebnisse
<b>SIRT4</b>	Steigerung	BSK	gesteigerte Insulinresistenz und positive Assoziation mit Bauchspeicheldrüsenkrebs	Stolzenberger-Solomon et al. 2005, Haigis, <i>et al</i> 2006
	Abnahme	<b>AML</b>	gesteigerte komplette Remission (besonders nach IT2)	eigene Ergebnisse
<b>SIRT5</b>	Steigerung/ Abnahme	<b>AML</b>	gesteigerte komplette Remission (besonders nach IT2)	eigene Ergebnisse

#### 4.1.5.3 Auswirkungen und mögliche Folgen identifizierter HDAC Expressionsveränderungen

##### 4.1.5.3.1 HDAC Expressionsveränderungen in AML und gesteigerte ROS Abwehr

Die Ergebnisse dieser Arbeit könnten darauf hindeuten, dass sich Krebszellen bzw. in diesem Fall speziell AML Zellen durch die Überexpression von SIRT1 und SIRT3 eine gesteigerte ROS Abwehr sicherstellen und dadurch eine Erhöhung der ROS Produktion durch die erhöhte Respiration verhindern bzw. ausgleichen könnten (vgl. 4.1.5.2.1) (wobei der ohnehin in Krebszellen gesteigerte Energieumsatz durch die deutliche Reduktion von SIRT4 in fast allen AML Proben noch mal gesteigert wird (4.1.5.2.2)). Ein Wegfall dieses Schutzmechanismus kommt bei AML / Krebszellen bei dem Einsatz von HDACi entsprechend viel mehr zum Tragen, als bei gesunden Zellen mit einem geringeren Aufkommen von ROS, so dass es in Krebszellen zum starken Anstieg der ROS und Apoptose kommt. Die entscheidende Rolle von ROS bei der HDACi Therapie bzw. Wirkung auf Krebszellen wird auch dadurch verdeutlicht, dass Resistenz von Krebszellen gegen HDACi mit einer erhöhten Kapazität der Krebszellen gegenüber ROS (z.B. durch gesteigerte Aktivität von Thioredoxin und Peroxiredoxinen und Redoxproteinen die beim Schutz vor ROS eine Rolle spielen) assoziiert ist (Marks and Xu 2009).

Die Feststellung, dass bei AML neben HDAC9 ganz besonders SIRT1, SIRT3 und HDAC6 signifikant hochreguliert sind, was zu einer stark erhöhten ROS Abwehr der AML Zellen führt, weist in diesem Zusammenhang auf eine Kombinationsbehandlung aus spezifischen HDACi gegen SIRT1, 3 und HDAC6 hin, mit dem Ziel einer Aufhebung bzw. Reduktion der erhöhten ROS-Abwehr als Schutz der Krebszellen vor den negativen Folgen von ROS, als besonders viel versprechend.



Durch die Identifizierung dieser Klasse II und III HDACs mit Expressionsveränderungen in AML und den sich daraus ergebenden Auswirkungen auf die Tumorbiologie und durch die Entwicklung spezifischerer HDAC Inhibitoren können gezielte neue HDAC-Inhibitortherapien entwickelt werden. Dabei könnten die Veränderungen in gezielter Inhibition und evtl. Aktivierung von Klasse II und III HDACs in Ergänzung zu der Inhibierung der Klasse I HDACs liegen, da Klasse I HDACs aufgrund ihrer Funktionen in der Pathogenese von AML (Rekrutierung in fehlregulierten Korepressorkomplexen und nicht auftretender signifikanter Expressionsunterschiede in AML Zellen), immer (als Gruppe) in die Therapien eingeschlossen werden.

Im Hinblick auf eine ableitbare Optimierungen der HDACi Therapie ist zu analysieren, ob trotz der vielfältigen Effekte der HDAC6 Expressionssteigerung auf Tumorinduktion, -Progression und -Angiogenese ein Ausbleiben einer Hemmung oder sogar eine gezielte zusätzliche Aktivierung der Expression oder Aktivität von HDAC6 in Kombination mit Inhibition der Klasse I und III HDACs und Zytostatika sinnvoll wäre, da eventuell aufgrund der HDAC6 induzierten Zellzyklussteigerung eine Steigerung der Effektivität der AML Zytostatika-Therapie bewirkt werden könnte, da die AML / Tumorzellen durch einen (zusätzlich) gesteigerten Zellzyklus noch anfälliger für die zytostatische Behandlung sein könnten, was auch eine Erklärung für die identifizierte Korrelation von gesteigerter HDAC6 Expression mit Therapieansprechen bzw. kompletter Remission sein könnte. Der kurzzeitige Effekt auf den Zellzyklus und die damit einhergehende verstärkte Anfälligkeit für die AML Therapie, könnte dabei stärker sein und eine eventuelle Auswirkung auf Tumorprogression überwiegen. Dabei sollte durch die Inhibierung von HDAC6 (gezielt durch Tubacin möglich) vor und nach Chemotherapie, in Ergänzung zu der stetigen Inhibition der Klasse I und III HDACs (speziell SIRT1 und 3), die Tumorprogression, -Angiogenese, -Migration und -Invasivität der eventuell verbleibenden AML Zellen inhibiert werden und einem Auftreten von Rezidiven entgegenwirken.

Die durch HDAC6 gehemmte Abwehr der reaktiven Sauerstoffspezies könnte aufgrund der Inhibierung der Klasse III HDACs, speziell SIRT1 und SIRT3, nicht mehr oder zumindest weniger ausgeglichen werden und der ROS Anstieg könnte dadurch voll zum Tragen kommen und zusätzlich zur Apoptose beitragen (vgl. 4.1.5).

Da eine geringere Expression von SIRT4 den positiven, protektiven Effekt durch SIRT1 und SIRT3 verstärkt, sollte SIRT4 nicht durch Einsatz eines HDAC Inhibitors gehemmt, sondern eher aktiviert werden, um die ATP Produktion der Tumor bzw. AML Zellen zu hemmen.

Die identifizierten HDAC Genexpressionsveränderungen in AML Zellen und dargelegten putativen neuen Therapieansätzen verdeutlichen, welche Potentiale in der Einbeziehung der bisher nicht berücksichtigter Sirtuine (besonders im Hinblick auf ROS induzierte Apoptose der Tumorzellen) und dem Einsatz HDAC-spezifischer Inhibitoren liegen.

Im Zusammenhang mit dem identifizierten AML-Subtyp M1 mit besonders hoch regulierten Expressionsleveln der analysierten HDACs ist hervorzuheben, dass dieser Subtyp der einzige ist, bei dem neben SIRT1 auch SIRT3 ohne Ausnahme in allen Proben deutlich hoch reguliert war. Entsprechend der Ergebnisse zum aktivierenden Effekt von SIRT1 und besonders SIRT3 auf den Energiemetabolismus (4.1.5.3.1, 4.3.3.5, 1.1.3.5), sowie den gerade beschriebenen Mechanismen, könnte dieser Subtyp einen besonders ausgeprägten Überlebensvorteil (durch gesteigerte ATP / Energieproduktion bei gleichzeitiger Reduktion der schädlichen ROS besitzen) besitzen (Abbildung 41) und eine ausgeprägtere Fähigkeit zum Überleben von toxischen oder Differenzierungsinduzierenden, chemotherapeutischen Agentien haben, was in zukünftigen Studien analysiert werden müsste.

#### **4.1.5.4 In Richtung spezifischer, zielgerichteter AML Therapie – Umsetzbarkeit putativer neuer spezifischer HDAC-Inhibitor Cocktails**

Die Umsetzung der spezifischen Hemmung bestimmter HDACs unterschiedlicher Klassen und eventuell sogar gleichzeitige Aktivierung anderer Mitglieder der HDAC Familie durch die Entwicklung von HDAC-Inhibitor-Cocktails wird aufgrund der Homologien der HDACs erschwert und so sind bisher meist nur unspezifische HDAC Inhibitoren im Einsatz, welche ganze HDAC Klassen (Klasse I und II aufgrund ihrer Zink-Abhängigkeit, z.B. SAHA, Valproat) zusammen hemmen (vgl. 1.1.5) und dabei zwar viel versprechende Ergebnisse besonders bei Leukämien zeigen, jedoch ebenfalls zahlreiche Nebenwirkungen (1.1.5) aufweisen (Bruserud, *et al* 2007), was ebenso wie patientenspezifisches Ansprechen (1.4.2) die Notwendigkeit einer Therapieoptimierung wie z.B. Dosisanpassungen verdeutlicht.

Durch die Entwicklung von spezifischen HDACi (1.1.5) bietet sich mit Bezug auf die dargestellten AML spezifischen HDAC Expressionsveränderungen und die beschriebenen Auswirkungen auf die Tumorbilogie bei AML die Möglichkeit einen spezifischen HDAC-Inhibitorcocktail gegen HDAC6, SIRT1 und SIRT3, bestehend aus Tubacin (HDAC6 Inhibitor (Haggarty, *et al* 2003) und z.B. Hexachlorophen (SIRT1-3 (Sanders, *et al* 2009)) zusammenzustellen und in Kombination (mit bisherigen Therapien und Klasse I HDACis) zu testen. Dabei ist hervorzuheben, dass HDACis, die spezifisch einzelne Mitglieder der HDAC Klassen (1.1.3) inhibieren, noch nicht besonders gut charakterisiert und getestet sind, wobei der HDAC6 Inhibitor Tubacin am besten untersucht ist und bekannt ist, dass er nicht direkt Apop-

tose induziert, aber synergistisch mit anderen Chemotherapeutika in Tumorzelllinien wirkt (Hideshima, *et al* 2005).

Der Mechanismus der bewirkt, dass Tumorzellen deutlich stärker und mit Apoptose auf HDACi reagieren, wohingegen gesunde Zellen weniger betroffen sind und eher nur im Zellzyklus stehen bleiben ist, wie unter 1.1.5 beschrieben, noch nicht eindeutig geklärt, wobei spekuliert wird, dass Krebszellen aufgrund ihrer multiplen Defekte die kritischen Effekte der HDACi nicht so gut umkehren bzw. abfangen können, wie gesunde Zellen (Marks and Xu 2009). Dieser Effekt sollte durch zusätzliche Hemmung von SIRT1 und SIRT3, welche bisher nicht miteinbezogen wurden und wichtige protektive Rollen bei der Stressantwort spielen (1.1.3.2), noch deutlich gesteigert werden und den Überlebensvorteil der Tumorzellen senken. Der Einsatz eines HDAC-Inhibitor-Cocktails erlaubt es auch ganz spezifische Anpassungen während eines längeren Therapiezeitraums, wie z.B. die beschriebene stetige Hemmung von SIRT1 und SIRT3 und den kurzzeitigen Stopp der HDAC6 Inhibierung kurz vor und während der Zytostatika Therapie.

Nach der Entwicklung solcher HDAC-Inhibitor Cocktails ist die Frage nach der klinischen Relevanz / Umsetzbarkeit durch entsprechende *in vitro* und klinische Studien zu analysieren.

Dabei sollte aufgrund der identifizierten starken Ausprägung der HDAC-Expressionsunterschiede (Steigerungen) besonders auf die Effekte bei AML M1 geachtet werden. AML M1 ist zu einem geringen Anteil (2 %) mit der prognostisch positiven Aberration t(8;21) (AML1/ETO) assoziiert (Klaus, *et al* 2004, Kohler, *et al* 1994,) und besitzt eine durchschnittliche / mittlere Prognose (www.cancer.org) und es wäre interessant in entsprechenden Studien zu analysieren, ob die aufgezeigten besonders ausgeprägten HDAC Expressionen dazu beitragen und ob durch den beschriebenen HDAC Inhibitor Einsatz besonders bei diesem Subtyp die Prognose bzw. der Therapieerfolg positiv beeinflusst werden kann.

## **4.2 Klasse I HDAC SNP Analysen in gesunden Probanden und AML Patienten**

Die Ergebnisse der Frequenzanalyse der *in silico* identifizierten putativen Klasse I HDAC nsSNPs, welche weder in gesunden noch in AML Patienten nachgewiesen werden konnten, deuten darauf hin, dass es sich bei den nicht validierten Datenbankeinträgen entweder um Falschpositive handelt, oder dass diese SNPs zumindest nicht in der kaukasischen Bevölkerung vorkommen (Dransfeld, *et al* 2007). Entsprechend konnten keine Korrelationsanalyse zu nsSNPs und Anfälligkeit für AML durchgeführt werden. Mit dem völligen Fehlen von nsSNPs liegen Klasse I HDACs deutlich unter dem Durchschnitt von zwei nsSNPs pro Gen

(1.3), was wiederum verdeutlicht, dass die Klasse I HDACs hoch konserviert sind (Ekwall 2005).

Nach Abschluss der Analysen wurden mittlerweile vier (rs11541185, rs1042903, rs467744, rs34901743) der 10 putativen nsSNPs auch in HapMap aufgeführt, wobei die Ergebnisse dieser Arbeit bestätigt werden, dass tatsächlich alle nicht in der kaukasischen Bevölkerung vorkommen, wobei nur letzterer zumindest in heterozygoter Form mit 13 % in der afrikanischen Bevölkerung auftritt. In der aktuellen Version der dbSNP Datenbank (Build 130) sind nach Abschluss der Analysen inzwischen zwei weitere nicht validierte putative nsSNPs (HDAC1 rs1140673 und HDAC2 rs1126962) aufgeführt, die aber (wie auch der putative HDAC1 SNP rs1140658, der aufgrund nicht herstellbarer Sonden nicht analysiert werden konnte) wiederum nicht in den anderen Datenbanken vorkommen, was dafür spricht, dass es sich auch hierbei um Falschpositive handelt.

### 4.3 SIRT3 SNPs – Identifikation, Validierung, funktionelle Analyse

Mitochondriale Fehlfunktionen sind mit einer Vielzahl von metabolischen und degenerativen Krankheiten und Krebs verbunden (zusammengefasst in (Pieczenik and Neustadt 2007, Wallace 2005)). Basierend auf den zentralen, vielfältigen bekannten und (durch den Anteil von 20 % acetylierter Proteine in Mitochondrien (Kim, *et al* 2006)) wahrscheinlichen Funktionen von der mitochondrialen Hauptdeacetylase SIRT3 könnten funktionelle SIRT3 SNPs eine pathophysiologische Signifikanz in diesem Kontext besitzen. Zusätzlich sollte speziell SIRT3 auch auf nsSNPs und deren funktionelle Auswirkungen hin untersucht werden, da SIRT3 nicht nur bei den AML-subtypspezifischen Genexpressionsanalysen in fast allen AML Proben hoch reguliert war, sondern auch als einziges Sirtuin neben SIRT7 eine nachgewiesene signifikante Korrelation mit Brustkrebs zeigte (Ashraf, *et al* 2006) und weil es im Verlauf dieser Arbeit immer mehr Publikationen zu diesem Sirtuin gab, welche viele zentrale Rollen von SIRT3 aufdeckten, wodurch es mehr und mehr aus dem Schatten von SIRT1, dem am besten analysierten Sirtuin hervortrat. Bisherige Studien zu SIRT3 SNPs gaben nur ein unvollständiges und widersprüchliches Bild zu der Existenz und Wirkung von SIRT3 SNPs, speziell im Bezug auf aging (Lescai, *et al* 2009). So postulierten Rose *et al.* einen Einfluss von einem SIRT3 SNP G477T auf Überleben im Alter (Rose, *et al* 2003), wobei dieser SNP zu gar keiner Veränderung auf Proteinebene führt (S159S) und die Autoren zeigten selber durch nachfolgende Analysen, dass der angenommene Einfluss dieses SNPs auf einer gemeinsam auftretenden VNTR (variablen Anzahl von Tandem-Wiederholungen) allelspezifischen Enhancer in Intron 5 basierte (Bellizzi, *et al* 2005). Da sich die Analysen der vorliegenden Arbeit auf

nicht-synonyme SNPs konzentrierten und weil auch eine Analyse von 2.461 Proben durch Lescai et al. weder den SNP noch den VNTR allelspezifischen Enhancer bestätigen konnten (Lescai, *et al* 2009), wurden sie nicht in die Analysen eingeschlossen. In dieser Studie wurde ein neuer SIRT3 SNP (rs939915) angegeben, der jedoch von uns durch Sequenzanalysen als ein SNP des benachbarten Gens *psmd13* aufgedeckt wurde.

Mit der Identifikation und Validierung von den beiden SIRT3 SNPs R80W und V208I und der Aufdeckung der anderen SNPs als nicht existent in der kaukasischen Bevölkerung (Dransfeld, *et al*) entstand ein klareres Bild der SIRT3 SNPs, was in zukünftigen Assoziationsstudien, welche Verbindungen der Sirtuinbiologie mit metabolischen und degenerativen Krankheiten und Krebs weiter aufklären, berücksichtigt werden sollte. Dabei zeigten die funktionellen Analysen, dass sich diese beiden SNPs aufgrund nicht signifikantem funktionellen Einfluss nicht für Assoziationsstudien eignen.

Die Ergebnisse der Identifikation, Validierung und der Analyse des Einflusses der beiden bestätigten SNPs auf die Aktivität und die Stabilität von SIRT3, welche (trotz der Vielzahl an SIRT3 Publikationen in jüngster Zeit) bisher nicht analysiert wurde, ist im Folgenden diskutiert.

#### 4.3.1 Identifikation und Validierung putativer SIRT3 SNPs

Während zum Zeitpunkt der Analysen die Allel-Frequenzanalysen der kaukasischen Bevölkerung nur für einen der beiden bestätigten SIRT3 SNPs (V208I) vorlag, welche leichte Abweichungen (um bis zu 12 %) aufwies, liegen mittlerweile auch Allel-Frequenzen (HapMap) der kaukasischen Bevölkerung für den bestätigten SIRT3 SNP R80W vor, welche mit 71,7 % wt, 26,5 % heterozygot und 1,8% homozygot für variantes Allel, sehr nahe an den hier ermittelten Werten (maximal 3,7 % Abweichung) liegen. Generell sind die in dieser Arbeit ermittelten Allel-Frequenzen aufgrund der deutlich höheren Probenanzahl von 640 im Vergleich zu 120 bei HapMap verlässlicher bzw. statistisch signifikanter. Die Angaben zu den nicht bestätigten SIRT3 SNPs wurden mittlerweile in den Datenbankeinträgen aktualisiert und bestätigen nun dass 100 % homozygote Vorkommen der Wildtypallele. Bis auf SNP G369S, der in der afrikanischen Bevölkerung zumindest in der heterozygoten Form (C/T 0,17 %) vorkommt, handelte es sich bei den anderen putativen SNPs tatsächlich um Falschpositive, da sie auch in den anderen Bevölkerungsgruppen nicht auftraten (HapMap).

Die Analysen zeigten entsprechend, dass besonders die dbSNP Datenbank Falschpositive Einträge aufweist, da sie auch nicht validierte Daten beinhaltet, wohingegen die Daten der HapMap Datenbank immer validiert sind.

Mittlerweile sind in der dbSNP Datenbank (build 130) drei neue nicht validierte nsSNPs (rs61748606, rs61744899 and rs551570) aufgeführt, wobei letzterer schon in der HapMap Datenbank als Falschpositiver aufgezeigt wurde (Int.-HapMap-Consortium 2003, Smigielski, *et al* 2000). Es ist anzunehmen, dass die beiden anderen nicht validierten nsSNPs ebenfalls Falschpositive sind, da sie nicht in HapMap gelistet sind, obwohl dieser Locus in HapMap schon in verschiedenen Populationen untersucht wurde und weil die Analysen dieser Arbeit aufdeckten, dass alle SNPs, die nur als nicht validierte SNPs in der dbSNP Datenbank enthalten waren, nicht bestätigt werden konnten.

#### **4.3.2 SIRT3 nsSNPs haben keinen Einfluss auf SIRT3 Stabilität und Aktivität**

Bei den Analysen putativer funktioneller Einflüsse der SIRT3 nsSNPs auf Aktivität und Stabilität, welche keine signifikanten Einflüsse aufzeigten, waren die Stabilitätsanalysen besonders interessant, da Computeranalysen von krankheitsbezogenen SNPs angaben, dass ca. 75 % der Mutationen das Protein destabilisieren und nur 7 % direkt die biochemische Funktion beeinflussen. Im Zusammenhang mit SNPs in krankheitsbezogenen Genen wurde gefolgert, dass Veränderungen der Proteinstabilität zu den wichtigsten Mechanismen monogenetischer Krankheiten gehören (Wang and Moulton 2001, Yue, *et al* 2005, Yue and Moulton 2006). Diese Computeranalyse gaben für nsSNPs ohne bekannten Krankheitsbezug eine (geringere) ca. 30 %ige Wahrscheinlichkeit für Verringerung der Stabilität an, was durch jüngste Studien bestätigt wurde (Allali-Hassani, *et al* 2009).

Das Hauptziel unserer Stabilitätsanalysen bestand in der Aufdeckung potentieller Unterschiede zwischen wtSIRT3 und den SNP-Mutanten, welche jedoch keinen signifikanten Einfluss auf die Stabilität aufzeigten (Dransfeld, *et al*).

Trotz zahlreicher Publikationen gibt es bisher keine Literaturangaben zu der Stabilität von SIRT3, so dass diese Analysen die ersten Hinweise auf die SIRT3 Stabilität darstellen.

Während die durchschnittliche Halbwertszeit von mitochondrialen Proteinen (bei Säugern) zwischen 3,5 bis 5 Tagen liegt, gibt es auch mitochondriale Proteine mit sehr kurzen Halbwertszeiten von 20 bis 80 min (Russell, *et al* 1982). Aufgrund der zentralen regulatorischen Funktionen von SIRT3 erwartet man eine eher kurze Halbwertszeit und es ist hervorzuheben, dass die hier ermittelte Halbwertszeit von 2-2,5 Tagen zwar schon unter dem Durchschnitt, aber evtl. noch über der tatsächlichen Halbwertszeit liegt, da SIRT3 ein zentrales Protein der Stressantwort ist, wie z.B. auch SIRT1 und p53, welche durch Stress, der auch durch CHX induziert wird (Aparna, *et al* 2003), stabilisiert werden. So ist z.B. SIRT1 bekannt, dass stressinduzierte Phosphorylierung für die Stabilisierung verantwortlich ist. SIRT1 besitzt un-

ter normalen Bedingungen eine Halbwertszeit von unter 2 h, wohingegen durch Phosphorylierung (an S27) stabilisiertes SIRT1 auch nach über 9h noch stabil ist (Ford, *et al* 2008). In diesem Zusammenhang könnte ebenfalls eine durch Cycloheximid ausgelösten stressinduzierte Phosphorylierung bei SIRT3 ausgelöst worden sein, welche das Ergebnis der Halbwertszeit verfälscht.

Es ist festzuhalten, dass die von uns verwendete Methode eine vergleichende (grobe) Analyse zwischen wt und SNP Varianten ermöglichte und eine maximale Halbwertszeit von SIRT3 von 2 bis 2,5 Tagen aufzeigte, keine sichere Bestimmung der tatsächlichen SIRT3 Stabilität unter „normalen“, stressfreien Bedingungen erlaubte, dessen genaue Bestimmung jedoch auch nicht Ziel der vorliegenden Arbeit war.

### **4.3.3 Monitoring der SIRT3 Bioaktivität**

Um die Ergebnisse der Analyse des funktionellen Einflusses der SIRT3 nsSNPs auf Aktivität und Stabilität zu verifizieren und zusätzlich die zentrale Rolle von SIRT3 im Energiemetabolismus in lebenden Zellen zu visualisieren, wurde mit der Kombination von transienter Transfektion und Biosensor-Chip-Analysen eine Methode etabliert, die eine Erfassung und online monitoring der Effekte von SIRT3 und dessen nsSNP Mutanten auf den zellulären Energiemetabolismus in einem System ermöglicht, dass das physiologische Milieu nachahmt und den zellulären Energiemetabolismus über Messung des Sauerstoffverbrauchs und der Ansäuerungsrate erfassen kann. Ein besonderer Vorteil der Methode besteht darin, dass es nicht um Endpunktanalysen von Zellmaterial handelt, welches für die Analysen durch Detektionsmarker oder Fixierungsschritte geschädigt oder zerstört wurde, sondern um Analysen in lebenden Zellen mit der Möglichkeit langfristige Veränderungen zu dokumentieren.

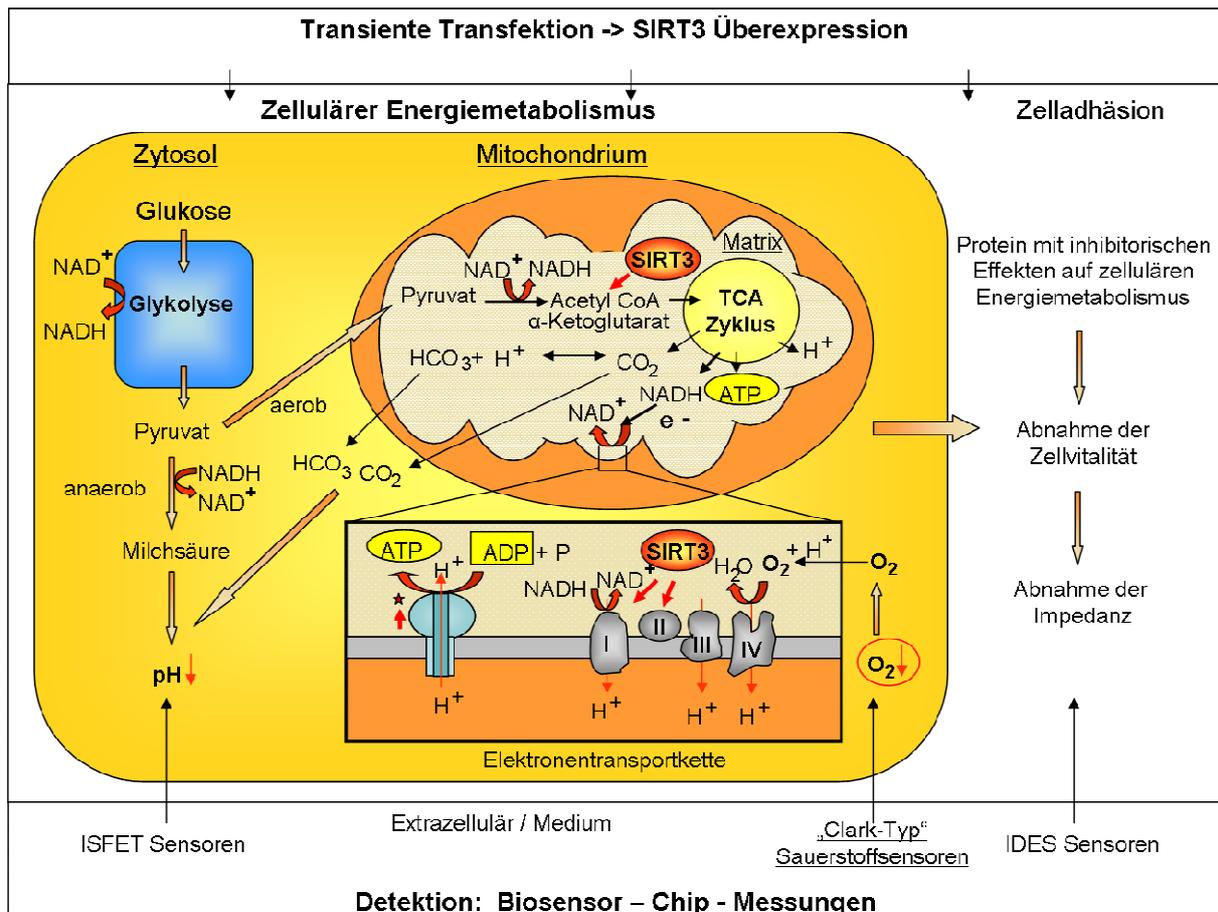
#### **4.3.3.1 Erfolgreiche Etablierung der Kombination transienter Transfektion und Biosensor-Chip-System zum online monitoring des Einflusses einzelner überexprimierter Proteine auf den Energiemetabolismus**

SIRT3 war für die Messungen in diesem System und zu dessen Etablierung aufgrund seiner zentralen direkten und indirekten Funktionen im Energiemetabolismus (1.1.3.5) besonders gut geeignet, was in folgendem Schema (Abbildung 42) des zellulären Energiemetabolismus mit den wichtigsten Einflusspunkten von SIRT3 sowie den zusammenhängenden Messparametern der Biosensor-Chips verdeutlicht werden soll.

Die SIRT3 Überexpression führt zum einen über direkte Interaktion über verstärkte Aktivierung von Acetyl-CoA-Synthetase II und Glutamatdehydrogenase zu Bereitstellung von mehr Acetyl-CoA und  $\alpha$ -Ketoglutarat für den Zitratzyklus und somit zu mehr NADH (1.1.3.2).

Zum anderen führt SIRT3 Überexpression über Aktivierung von Komplex I und II der mitochondrialen Atmungskette zu einem Respirationsanstieg und entsprechend erhöhtem Sauerstoffverbrauch, der über die „Clark-Typ“ Elektroden der Biosensor-Chips erfasst wurde.

Die zusätzlichen indirekten Effekte wie z.B. die Steigerung des Energiemetabolismus durch Steigerung der Mitochondrienbiogenese über die Aktivierung der PGC-1 $\alpha$  (Shi, *et al* 2005), sind in diesem Schema nicht enthalten, verdeutlichen aber zusätzlich den großen Einfluss von SIRT3 und dass SIRT3 besonders für die Etablierung dieser Methode geeignet war.



**Abbildung 42: Monitoring von SIRT3 Bioaktivität im zellulären Energiemetabolismus mittels Biosensor-Chip System.**

Durch SIRT3 Überexpression kommt es, neben einem Anstieg der Konzentration von  $\alpha$ -Ketoglutarat und Acetyl-CoA in den TCA Zyklus, zu einer verstärkten direkten Aktivierung der mitochondrialen Atmungskette über Deacetylierung von Komplex I und II, sowie indirekt z.B. durch Steigerung der Expression von Komplex V (Sternchen) und entsprechend zu einem erhöhten Sauerstoffverbrauch, welcher über „Clark-Typ“ Sauerstoffsensoren detektiert wird. (Referenzen siehe Text)

Durch den Nachweis der Korrelation des Anstiegs der Respiration mit dem Anstieg des zellulären SIRT3 Levels durch die kinetischen Analysen (Abbildung 30) konnte entsprechend die erfolgreiche Etablierung des Systems nachgewiesen werden.

#### 4.3.3.2 Vorteile und Einschränkungen der Methode

Die Vorteile der Kombination von transienter Transfektion und den Biosensor-Chip Analysen bestehen neben der Ermöglichung der Analyse des Einflusses einzelner Proteine auf den Zellmetabolismus in lebenden Zellen über längere Zeiträume, in der Möglichkeit den Einfluss von Mutanten zu erfassen, wobei dabei nicht nur ein Aspekt wie Aktivität oder Stabilität, sondern viele Aspekte auf einmal erfasst werden (vgl. auch 4.3.3.3). Entsprechend kann die Methode entweder dazu genutzt werden, um generelle Wirkungen abzuschätzen, um bei vorhandenem Effekt in weiteren Analysen nach dem genauen Effekt zu suchen, oder um abschließend jedweden Effekt auszuschließen bzw. zu verifizieren.

Des Weiteren könnte diese Methode zur Analyse des Einflusses von einzelnen, oder mehreren Expressionsveränderungen (Überexpression und oder Herunterregulation) spezifischer Proteine auf die Behandlung mit unterschiedlichen Stoffen bzw. Therapeutika (welche über die angeschlossenen Mediumsbehälter und Pumpen zugegeben werden können) genutzt werden, um z.B. den Effekt von SNPs auf Therapieansprechen abschätzen zu können.

Generell sollte in Zusammenhang mit der Nutzung dieser Methode zur Analyse des Einflusses einzelner überexprimierter (oder auch ausgeschalteter) Gene auf den Energiemetabolismus hervorgehoben werden, dass aufgrund der durchschnittlichen Standardabweichungen von 10 % das Protein von Interesse einen deutlichen Effekt von über 10 % haben muss, um zu signifikanten Ergebnissen zu führen.

#### 4.3.3.3 SIRT3 SNPs haben keinen Einfluss auf SIRT3 Bioaktivität

Die Ergebnisse der abschließenden Analysen des putativen Einflusses der SIRT3 SNP-Mutanten auf die Bioaktivität bzw. Funktionalität von SIRT3 im zellulären Metabolismus mit dem Biosensor-Chip-System stehen im Einklang mit den Analysen zur Stabilität und Deacetylierungsaktivität, da in allen Analysen kein signifikanter Unterschied zwischen wtSIRT3 und SIRT3 SNP-Mutanten zu erkennen war, so dass ein signifikanter Effekt ausgeschlossen werden kann.

Es ist hervorzuheben, dass mit dieser Methode eigentlich alle möglichen Einflüsse der nsSNPs auf SIRT3 erfasst werden müssten; So müsste neben der Aktivität und Stabilität auch putative Unterschiede in der Lokalisierung erfasst werden, da SIRT3 nur dann aktiv ist, wenn es in der mitochondrialen Matrix prozessiert wurde (Schwer, *et al* 2002) und als aktives Protein mit Untereinheiten des Komplexes I der mitochondrialen Atmungskette interagieren (Ahn, *et al* 2008) und die Respiration steigern kann.

Die Biosensor-Chip-Analysen bestätigen also nicht nur die Ergebnisse der Aktivitäts- und Stabilitätsanalysen, sondern zeigen außerdem, dass die SNPs keinen Einfluss auf die „Bioaktivität“ bzw. Funktionalität von SIRT3 im zellulären Energiemetabolismus haben und deuten darauf hin, dass die beiden nsSNPs ebenfalls keinen signifikanten Einfluss auf die SIRT3 Lokalisierung haben.

#### 4.3.3.4 Erklärung des fehlenden Einflusses der SIRT3 SNPS

Trotz der Lokalisierung in der konservierten Deacetylasedomäne von SIRT3 und der Identifikation einer potenziellen Glykosylierungsstelle an Aminosäureposition 207-210 (Onyango, *et al* 2002), war es nicht besonders wahrscheinlich, dass der SIRT3 SNP V208I einen signifikanten Effekt auf Proteinebene hat, da der hervorgerufene Aminosäureaustausch zwischen zwei Aminosäuren der gleichen biochemischen Gruppe stattfand (Valin zu Isoleucin (aliphatisch)).

Die Lage des SNPs in einer potentiellen Glykosylierungsstelle war dabei besonders interessant, da Glykosylierung Einfluss auf Stabilität haben kann (Vegarud and Christnsen 1975), allerdings erfolgt die Glykosylierung nur an Asparagin, Serin oder Threonin.

Bei dem SIRT3 SNP R80W kommt es zu einem Austausch einer positiv geladenen, hoch basischen Aminosäure (Arginin) in eine aromatische, neutrale Aminosäure (Tryptophan), was gute Voraussetzungen für einen Effekt auf Proteinebene darstellt. Das Fehlen einer Auswirkung dieses SNPs könnte durch die N-terminale Lokalisierung erklärt werden, da diese Region nach dem Import in Mitochondrien abgeschnitten wird und somit bei dem aktiven SIRT3 nicht mehr vorliegt und scheinbar keinen Einfluss auf den Import und die Prozessierung hat.

#### 4.3.3.5 SIRT3 hat größeren steigernden Effekt auf Respiration als SIRT1

In der Literatur gibt es zahlreiche Hinweise für aktivierende Effekte von SIRT1 (SIRT1 und UCP2 (Bordone, *et al* 2006), UCP3 (Amat, *et al* 2007), PGC1 (Rodgers, *et al* 2008)) und SIRT3 (Shi, *et al* 2005) auf den Energiemetabolismus, aber die vergleichenden Biosensor-Chip Analysen stellen die ersten direkten vergleichenden, quantitativen Analysen von wtSIRT3 mit wtSIRT1 im Zusammenhang mit dem zellulären Metabolismus dar.

Der stärkere steigernde Effekt auf die zelluläre Respiration von SIRT3 beruht wohl darauf, dass SIRT3 im Gegensatz zu SIRT1 sowohl indirekte (Hallows, *et al* 2006, Shi, *et al* 2005), als auch direkte aktivierende Effekte auf den Energiemetabolismus, speziell die Respiration besitzt ((Ahn, *et al* 2008), Abbildung 42). So kann SIRT1 den zellulären Metabolismus indirekt beeinflussen über die Regulation der Genexpression mitochondrialer Gene (1.1.3.5).

SIRT3 hingegen besitzt wie unter 1.1.3.5 beschrieben ebenfalls diese indirekten Regulationswege und zusätzlich direkte aktivierende Effekte auf die Atmungskette, sowie weiterhin aktivierende Mechanismen im Energiemetabolismus über Acetyl-CoA-Synthetase und GDH.

Alle diese Daten (vgl. 4.1.5.2.1) helfen den starken steigernden Einfluss von SIRT3 auf die Respiration zu verstehen und unterstreichen die Bedeutung von SIRT3 im zellulären Energiemetabolismus.

Unter Berücksichtigung der Transfektionseffizienz von 50 – 60 % stellen die gemessenen 40 bzw. 15 % Respirationssteigerung durch SIRT3 bzw. SIRT1 nicht das volle Potential dar, welches bei einer 100 % Transfektionseffizienz bei ca. 80 % für SIRT3 und 30% für SIRT1 liegen könnte. Eine 80-%tige Respirationssteigerung durch SIRT3 stimmt mit in vitro Daten überein, welche eine 80 % Respirationssteigerung in HIB1B Zellen zeigten, die murines SIRT3 überexprimierten (Shi, *et al* 2005).

Die in lebenden Zellen nachgewiesenen starken steigernden Effekte von SIRT3 auf die zelluläre Respiration verdeutlichen neben den anderen bekannten Funktionen (1.1.3.4) die immer deutlicher werdende Rolle von SIRT3 im Kontext des Zellüberlebens, Zellmetabolismus, degenerativen Krankheiten und Krebs (neben SIRT1) und verdeutlichen weiterhin, dass die erstaunlichen Funktionen von Sir2 in Modellorganismen (wie Hefe, *Caenorhabditis elegans* und *Drosophila Melanogaster*) beim Menschen nur ausreichend beurteilt werden können durch Kombinationsanalysen, die alle oder zumindest die prominentesten humanen Vertreter, zu denen neben SIRT1 auch SIRT3 gehört, berücksichtigen.

#### **4.4 AML Pharmakogenetik – SNPs in Ara-C metabolisierenden Enzymen**

Bis heute ist auch die AML Therapie mit Ara-C dem effektivsten Standardtherapeutikum mit dem Problem immer wieder auftretenden der patientenspezifischer Unterschiede bei Therapieansprechen und auftretenden Nebenwirkungen konfrontiert und es ist schon lange bekannt, dass diese zum Teil auf Unterschieden in der Ara-C Metabolisierung beruhen (Harris and Grahame-Smith 1982) und dass die beschriebenen Schlüsselenzyme der Ara-C Aktivierung und Inaktivierung (1.2.5.2) dabei eine besondere Rolle spielen (vgl. 1.2.5.4).

Da SNPs, speziell nicht synonyme SNPs (nsSNPs) und Promotor-SNPs, eine Hauptursache für genetisch bedingte Unterschiede der Genexpression und Proteinaktivität darstellen (1.3), wurden im Rahmen der pharmakogenomischen Analysen zur weiteren Aufklärung der patientenspezifischen Unterschiede beim Ansprechen und Auftreten von Nebenwirkungen bei der

Ara-C Therapie entsprechende SNP Kandidaten identifiziert, validiert und auf entsprechende Korrelationen analysiert (Mahlknecht, *et al* 2009).

Es ist hervorzuheben, dass zwar schon Korrelationsanalysen von SNPs in Genen von Proteinen mit Funktionen im Ara-C Metabolismus und Therapieansprechen durchgeführt wurden, aber dabei handelte es sich meist um Studien, die sich mit wenigen SNPs und einzelnen Genen und meist in anderen Bevölkerungsgruppen (meist asiatischen Populationen) in einer deutlich geringeren Probenanzahl und meist im Zusammenhang mit anderen Tumoren und mit anderen Antimetaboliten (z.B. Gemcitabin) beschäftigten (vgl.1.3.1).

Die hervorzuhebenden Vorteile dieser Analysen bestehen also sowohl in der statistisch signifikanten großen Probenanzahl von 360 AML Patienten, als auch darin, dass sie Informationen in der kaukasischen (europäischen) Bevölkerung lieferte und dass mehrere SNPs in Kombination analysiert wurden.

#### **4.4.1 Identifikation und Validierung von Promotor- und nsSNPs in Enzymen des Ara-C Metabolismus**

Die Validierung der über *in silico* Analyse und Literatur Recherche identifizierten putativen SNPs der drei analysierten Schlüsselenzyme des Ara-C Metabolismus (1.2.5.2) konnte 4 SNPs nicht bestätigen, was darauf hindeutet, dass es sich bei diesen SNPs entweder um „Falsch-Positive“ Datenbankeinträge darstellen können oder dass diese SNPs zumindest in der kaukasischen Bevölkerung zu selten bzw. gar nicht auftreten. Letzteres trifft auf den SNP G208A zu, der in der japanischen Bevölkerung vorkommt (mit Frequenzen von 4,3 %) und sogar zu einer signifikante Reduktion der Aktivität der CDA führt (Yue, *et al* 2003) und in neuen Studien mit langsamerem Abbau der Gemcitabin Konzentration im Plasma (Clearance) nachgewiesen wurde (Sugiyama, *et al* 2007, Ueno, *et al* 2009). SNP G208A wurde auch in einer anderen Studie in der kaukasischen Bevölkerung analysiert und konnte dabei ebenfalls nicht bestätigt werden (Fitzgerald, *et al* 2006). Des Weiteren wurde er mittlerweile auch in der Datenbank dbSNP aufgeführt, wobei bestätigt wird, dass er nicht in der kaukasischen, sondern nur in der asiatischen Bevölkerung auftritt (5,5 %), wodurch unsere Analysen bestätigt werden. Der DCTD SNP A172G (Asn58Asp), welcher in dieser Studie nicht bestätigt werden konnte, zeigte auch in einer anderen Studie in kaukasischer, Amerikanischer Bevölkerung nur eine Frequenz von unter 1 %, wobei für den SNP ein stark inhibierender Effekt auf die DCTD Aktivität (11 % des WT) gezeigt werden konnte, weshalb der SNP in die Analysen aufgenommen wurde (Gilbert, *et al* 2006).

Das identifizierte Kopplungsungleichgewicht (Linkage disequilibrium) von SNP A79C, A-92G und C-451T, welche in hoher und ähnlicher Frequenz auftreten, steht in Einklang mit früheren Studien (Sugiyama, *et al* 2007) und unterstützt die Richtigkeit unserer Analysen.

Es ist noch zu hervorzuheben, dass die statistischen Auswertungen unserer Korrelationsanalysen nur signifikante Korrelationen für den CDA SNP C-451T ergaben, obwohl auch für den SNP A79C ein reduzierender Effekt auf die CDA Aktivität gezeigt wurde (Giovannetti, *et al* 2008, Kirch, *et al* 1998). Dies könnte darauf hindeuten, dass der reduzierende Effekt (1,3-3 fach *in vitro*) auf CDA Aktivität durch den CDA SNP A79C nicht ausgeprägt genug ist bzw. alleine nicht ausreicht, um eine signifikante Korrelation mit Überleben hervorzurufen, sondern dass der die CDA Expression verringernde Effekt durch SNP C-451T (vgl. 4.4.3 (Fitzgerald, *et al* 2006)) eine deutlich stärkere Auswirkungen bzw. eine stärkere klinische Relevanz hat, als die Verringerung der Aktivität durch A79C. Ein weitere Punkt der dafür spricht, dass der Effekt von C-451T die eigentliche Ursache ist, stellt eine vergleichenden Studie zu dem Effekt von CDA SNPs A79C und G208A auf die Plasma-Aktivität von CDA da, welche zeigte, dass (im Gegensatz zu G208A) für A79C kein Effekt nachgewiesen werden konnte (Sugiyama, *et al* 2007).

In diesem Zusammenhang ist eine Korrelationsstudie zu erwähnen, in welcher der CDA SNP A79C mit einer erhöhten therapiebedingten Sterblichkeit korreliert wurde (Bhatla, *et al* 2009), wobei die Autoren schon selber diskutierten, dass andere, nicht berücksichtigte, Polymorphismen einen Einfluss haben könnten. Da in dieser Studie nur der A79C SNP angeschaut wurde, welcher jedoch meist gemeinsam mit C-451T auftritt und C-451T den Effekt von A79C scheinbar überwiegt, ist anzunehmen, dass C-451T die eigentliche Ursache dieses Effektes war. Das wird entsprechend durch die in der vorliegenden Studie durchgeführten Multivarianzanalysen verdeutlicht, die zeigten, dass die Korrelationen nur für C-451T signifikant sind.

Nach Abschluss unserer Analysen wurden noch weitere nsSNPs in der dbSNP Datenbank hinzugefügt. Bei der CDA wurde rs17854868 (Lys26Asn) zugefügt, welcher jedoch nicht validiert wurde und nicht in HapMap aufgeführt wird, d.h. es handelt sich wohl um einen Falsch-Positiven SNP.

Bei der Desoxycytidin Kinase (DCK) erscheinen in der NCBI Datenbank (dbSNP, (Sherry, *et al* 2001)) mittlerweile 5 nsSNPs, wobei es sich bei 4 davon tatsächlich nur um 2 verschiedene SNPs handelt. So sind sowohl rs66878317 und rs66878318 (Ile24Val), als auch rs67437265 und rs67437266 (Pro122Ser) identisch. Bei letzterem handelt es sich um den in dieser Studie analysierten SNP C364T, welcher in der Datenbank mit Frequenzen von 1,1 – 3,8 % in unbe-

kanter Population angegeben sind, was etwas über der in dieser Studie (3.4.1) ermittelten Frequenz von unter 2 % in der kaukasischen Bevölkerung liegt. Neben diesem analysierten SNP sind also nur 2 weitere nsSNPs Ile24Val sowie Ala119Gly (rs66472932) hinzugekommen, wobei für diese beiden neuen nsSNPs schon gezeigt wurde, dass sie nur in der afrikanischen Bevölkerung (mit geringer Frequenz von 2,5 % und 1,7%) auftreten (Lamba, *et al* 2007) und entsprechend nicht im vorliegenden Probenpool zu berücksichtigen sind.

Auch bei der Deoxycytidylat Deaminase (DCTD) sind zwei neue nsSNP Einträge vorhanden, wobei wiederum beide nicht in HapMap aufgeführt sind und einer (rs35932500, Asp69Asn) mit einer sehr geringen Frequenz von 2,8 % auftritt, wobei die Population nicht genau definiert ist, was dafür spricht ihn in zukünftigen Analysen zu berücksichtigen. Der zweite (rs17849458) weist keine Validierung auf und ist entsprechend eher ein weiterer Falschpositiver SNP.

Zusammenfassend führte die Aufdeckung der DCK und DCTD SNPs als Falsch-Positive bzw. das Fehlen der varianten Form in der europäischen Bevölkerung zu einer Beschränkung der Analysen auf 3 SNPs der Cytidin Deaminase und es konnte zwar kein Markerset, aber CDA SNP C-451T als unabhängiger prognostischer Marker identifiziert werden (4.4.2, (Mahlknecht, *et al* 2009)).

#### **4.4.2 CDA SNP C-451T - ein neuer prognostischer Marker**

Mit der durch Multivaranalysen statistisch abgesicherten Identifizierung von CDA SNP C-451T als neuen unabhängigen prognostischen Marker für um 50 % verringertes Gesamtüberleben (bei homozygot varianten Genotyp) und erhöhtes Risiko von Nebenwirkungen der Ara-C Therapie (Augentoxizität) konnte durch die vorliegende Arbeit ein Beitrag in Richtung verbesserter Prognose und patientenspezifischer Therapie, speziell im Hinblick auf Dosisanpassung der Ara-C Standardtherapiedosis (bei Patienten mit dem CDA SNP C-451T), geleistet werden. Durch gemeinsame Berücksichtigung dieses SNP und aller bisher identifizierten SNPs mit Einfluss auf den Ara-C Metabolismus (1.3.1, zusammengefasst in (Roumier and Cheok 2009)) könnte eine Art SNP-Markerset und ein entsprechendes „Test-Kit“ (SNP-Assay-Sammlung) entwickelt werden, um vor einer Ara-C Therapie all diese bekannten Einflussfaktoren zu erfassen und bei der Therapie (Dosis) zu berücksichtigen (vgl. 4.4.6).

Die Studie, welche die auftretende Korrelation mit erhöhter (therapiebedingter) Sterblichkeit mit A79C statt C-451T verband (Bhatla, *et al* 2009), unterstützt die vorliegenden Ergebnisse, da wie zuvor beschrieben C-451T, welcher in der Studie nicht berücksichtigt wurde und meist mit A79C gemeinsam auftritt, die eigentliche Ursache des Effekts darstellt (4.4.1).

Neben dem zugrunde liegenden Mechanismus (4.4.3) des CDA SNP C-451T sind auch die Korrelationen mit erhöhtem Auftreten von Nebenwirkungen (4.4.4) und verringertem Gesamtüberleben (4.4.5) noch zu diskutieren bzw. zu erläutern.

#### 4.4.3 Mechanismus hinter der prognostischen Funktion von CDA SNP C-451T

Nach der Identifikation von CDA SNP C-451T als neuem prognostischem Marker stellte sich natürlich die Frage nach dem dahinter liegenden Mechanismus.

Die Wirkung von C-451T wurde schon von Fitzgerald et al. 2006 analysiert und beschrieben, dass es durch C-451T, in der varianten Form zu einer starken (75 %) Inhibition der CDA Expression kommt (Fitzgerald, *et al* 2006).

Die nahe liegende Ursache dieser Wirkung ist eine Veränderung der Transkriptionsfaktorbindestelle durch den Austausch von C zu T an Position -451. Es ist auch schon in der Literatur beschrieben, dass der proximale Promotor des CDA Gens mehrere Transkriptionsfaktoren enthält, welche die CDA Expression *in vivo* regulieren und *in vitro* Promotoraktivität zeigten (Demontis, *et al* 1998, Fitzgerald, *et al* 2006, Ge, *et al* 2004, Watanabe and Uchida 1996).

Für den SNP C-451T wurde von Fitzgerald et al. 2006 über *in silico* Analysen mittels der TRANSFAC Datenbank (<http://www.gene-regulation.com>; <http://www.genomatrix.de>) eine Veränderung einer ETS1 Bindestelle zu einer LYF1 Bindestelle beschrieben. Dabei ist ETS1 ein (angiogenese stimulierender) Transkriptionsaktivator (Sharrocks, *et al* 1997) während LYF1 (alias IKZF1) als starker Transkriptionsrepressor wirken kann, der u.a. in Korepressor-komplexen mit HDACs agiert (Koipally, *et al* 1999), was die Verringerung der CDA Expression durch die variante Form erklären würde.

Die neueren Studien haben Bindestellen und eine Regulation über GATA-1 Bindestellen (z.B. -475 bis -478) nachgewiesen (Ge, *et al* 2004, Ge, *et al* 2005, Muntean, *et al* 2006) und diskutierten, dass eine Verringerung der GATA-1 Transaktivierungsaktivität zu verringerter CDA Expression und erhöhter Ara-C Sensitivität führen könnte.

Interessanterweise ergab eine eigene *in silico* Analyse mittels dem Programm TF Search (3.4.2.2) eine GATA-1 Bindestelle (91,4 %) an Position des SNPs C-451T, welche durch den Basenaustausch von Cytosin zu Thymin nicht mehr vorhanden wäre (Abbildung 38), wodurch der Enhancer Effekt entfallen würde, was den eben beschriebenen Effekt einer Verringerung der CDA Expression zur Folge hätte und somit eine weitere Erklärung der Wirkung des C-451T SNPs darstellt.

#### 4.4.4 Erklärung für Korrelation CDA SNP C-451T mit Grad III/IV Augentoxizität

Es ist schon lange bekannt, dass Augentoxizität als Nebenwirkung von Ara-C Therapie von der Dosis und Dauer der Ara-C Therapie abhängig ist (Ritch, *et al* 1983).

Aufgrund des nachgewiesenen hemmenden Einflusses des SNP C-451T auf die CDA Expression wurde entsprechend schon von Fitzgerald *et al.* ein Anstieg der Toxizität und Nebenwirkungen unter Standard Dosis Ara-C angenommen (Fitzgerald, *et al* 2006), was durch die vorliegenden Ergebnisse der Korrelationen von C-451T mit Grad III/IV Augentoxizität bestätigt wurde. Diese Korrelation kann dadurch erklärt werden, dass es durch Reduktion der CDA Expression zur Reduktion des Levels von aktivem CDA, welches Ara-C irreversibel inaktivieren würde und somit zu einem Anstieg der intrazellulären Ara-C Konzentration kommt. Eine entsprechende Korrelation eines Anstiegs der intrazellulären Ara-C Konzentration und erhöhter Ara-C Sensitivität aufgrund verringerter CDA Expression (Chabner, *et al* 1979, Ge, *et al* 2004, Ge, *et al* 2005, Lamba 2009, Muntean, *et al* 2006) bzw. Aktivität (z.B. durch SNP (Yue, *et al* 2003)) wurde schon mehrfach beschrieben (diskutiert).

Da CDA durch die irreversible Inaktivierung von Ara-C maßgeblich an der kurzen Halbwertszeit von Ara-C von 2-6 h verantwortlich ist (1.2.5.3), kommt es durch die SNP bedingte Reduktion des CDA Levels neben der erhöhten Ara-C Konzentration wohl auch zu einer längeren Halbwertszeit von Ara-C und zu einer längeren Exposition mit aktivem Ara-C, was eine weitere Erklärung für eine stärkere Auswirkung der Augentoxizität sein könnte.

Es ist dabei hervorzuheben, dass als Hauptursache der Augentoxizität ein signifikanter Anstieg der Ara-C Konzentration in der Zerebrospinalflüssigkeit angesehen wird (Slevin, *et al* 1983), in welcher Ara-C langsamer abgebaut wird (Ho and Frei 1971) und eine deutlich verlängerte Halbwertszeit hat (mit bis zu 24h zytotoxischen Ara-C Leveln) als im Plasma (Kwong, *et al* 2009, Lopez, *et al* 1985, Slevin, *et al* 1983). Dass die Ara-C Toxizität nur bei der Augentoxizität signifikante Korrelationen zeigte, könnte daher dadurch erklärt werden, dass die Auswirkungen durch den C-451T SNP, eine Verringerung der CDA Expression und der Effekt eines zusätzlich verlangsamten Ara-C Abbaus dort stärker zum Tragen kommt. Die verdeutlicht wiederum, dass nicht die Plasmakonzentrationen von Ara-C, sondern die intrazellulären Ara-C Konzentrationen mit den zytotoxischen Effekten assoziiert sind (Milano, *et al* 2002).

#### 4.4.5 Erklärung für Korrelation C-451T mit verringerter Gesamtüberlebensrate

Die durch C-451T erhöhte intrazelluläre Ara-C Konzentration und vor allem die längere Halbwertszeit könnten auch dazu führen, dass Ara-C in stärkerem Ausmaß auch gesunde Zellen schädigt, welche bei normalem Ara-C Abbau diesem nur kurz ausgesetzt wären, was aufgrund der geringeren Teilungsrate gegenüber den Krebszellen geringeren Schaden anrichtet, da Ara-C speziell bei der Replikation schädigend bzw. apoptoseinduzierend wirkt (1.2.5.1).

Eventuell entstehen vermehrt Schäden (Einbau Ara-C in die DNA) in gesunden Zellen, die jedoch aufgrund geringeren Ausmaßes nicht sofort Effekte zeigen (aufgrund geringeren Ausmaßes überleben die Zellen), sondern erst mit der Zeit zu sich akkumulierenden weiteren Schäden führen, die sich negativ auf die Gesundheit bzw. die Überlebensfähigkeit auswirken und evtl. andere Krankheiten (z.B. Immunschwäche) hervorrufen; was eine Erklärung für den negativen Einfluss des CDA SNP C-451T auf die 5 Jahres Gesamtüberlebensrate darstellen könnte.

Ein Ähnlicher Effekt, der diese mögliche Erklärung unterstützt ist das „Ara-C Phänomen“. So ist bekannt, dass eine kurze Verabreichung von Ara-C in mittlerer (0,1-1g/m<sup>2</sup> alle 12h, 6 Dosen) bis hoher Konzentration (2-3g/m<sup>2</sup> alle 12h für 5-6 Tage) zu optimaler Wirkung (Schädigung der Krebszellen und komplette Remission) bei geringeren Nebenwirkungen führt (Early, *et al* 1982, Harousseau, *et al* 1989), während eine lang anhaltende Verabreichung einer geringen Konzentration (0,005-0,01g/m<sup>2</sup> alle 12 h für 10-21 Tage) zu extrem verstärkten Nebenwirkungen führt (Winter, *et al* 1985). In diesem Zusammenhang könnte der durch C-451T angenommene langsamere Ara-C Abbau bzw. länger anhaltende toxische intrazelluläre Ara-C Konzentration (4.4.3) dem Effekt einer länger anhaltenden Therapie mit geringerer Ara-C Konzentration ähneln und entsprechend wie oben beschrieben Schäden hervorrufen, die das Gesamtüberleben negativ beeinflussen.

#### 4.4.6 Mit CDA SNP C-451T in Richtung SNP-Markerset

Es ist hervorzuheben, dass es immer mehrere Determinanten bei der Vorhersage des Therapieansprechens und den Nebenwirkungen gibt, was sehr schön von Evans *et al.* 2003 verdeutlicht wurde, als er die „polygenetische Komponenten der Medikamenten-Antwort“ durch zwei sich beeinflussende genetische Polymorphismen veranschaulichte und illustrierte wie die Medikamentenwirkung durch unterschiedliche Ausprägung (Hetero- oder Homozygotie der Varianten Form) von SNPs in einem Medikamenten-metabolisierenden Enzym (Abbau) und in einem Medikamentenrezeptor (Effizienz) beeinflusst (verstärkt oder ausgeglichen) wird (Evans and McLeod 2003).

Auch im Ara-C Metabolismus gibt es, wie schon beschrieben (1.2.5.2), viele Komponenten durch viele beteiligte Ara-C metabolisierende Enzyme und Transporter, für die zum Teil schon einige SNPs mit Einfluss auf deren Aktivität/Funktionalität (Kinetik) oder Expressionsstärke nachgewiesen wurden. Das heißt, der von uns identifizierte CDA SNP C-451T muss mit den anderen bekannten SNPs zusammen betrachtet werden, um die „gesamte“ Wirkung abschätzen zu können. So könnten sich z.B. bei Auftreten von Cytidine Deaminase (CDA) SNP C-451T, welcher zu erhöhter intrazellulären Ara-C Konzentration führen würde, gemeinsam mit den Desoxizytidine Kinase (DCK) SNPs C-360G und C-201T, welche über geringere DCK Expression zu reduzierter Ara-C Aktivierung führen (Shi, *et al* 2004), die Effekte gegenseitig aufheben.

Nach der vollständigen Identifizierung aller SNPs mit klinischer Relevanz werden also noch weitere Analysen notwendig sein, bis ein vollständiges SNP-Marker-Set zur „vollständigen“ prognostischen Beurteilung bzw. Abschätzung eventueller Wechselwirkungen zur Verfügung steht. In diesem Zusammenhang ist zu erwähnen, dass bei der Ara-C Therapie noch andere Medikamente wie z.B. Anthrazykline eingesetzt werden, so dass in Hinblick auf ein vollständiges Markerset entsprechend auch SNPs in metabolisierenden Enzymen und Transportern dieser Stoffe, für die ebenfalls schon einige klinisch relevante SNPs bekannt sind (z.B. MDR1 Polymorphismen (Illmer, *et al* 2002)), mit einbezogen werden sollten.

Nichtsdestoweniger bleibt festzuhalten, dass durch die Identifizierung des CDA SNPs C-451T als neuen prognostischen Markers im Ara-C Metabolismus (bzw. AML Therapie) (Mahlknecht, *et al* 2009) eine weitere polygenetische Komponente der Ara-C Antwort aufgedeckt wurde und auch schon in aktuelle Reviews zur Pharmakogenomik in AML (Roumier and Cheok 2009) und genetischen Einflussfaktoren der Ara-C Therapie (Lamba 2009) aufgenommen wurde und somit einen Teil zur Weiterentwicklung im Bereich Pharmakogenomik und patientenspezifischer AML Therapie und dem Ziel der Erstellung eines SNP Markersets beigetragen wurde.

## 5 Zusammenfassung

Fehlregulationen von Histondeacetylasen (HDACs) sind entscheidende Ereignisse der Pathogenese der *akuten myeloischen Leukämie (AML)* und die Basis für innovative, epigenetische Behandlungsstrategien, zu denen besonders der Einsatz von HDAC-Inhibitoren zählt. Durch die AML-Subtypspezifischen Genexpressionsanalysen konnten Unterschiede im Expressionsmuster der HDACs aufgedeckt und AML M1 als Subtyp mit signifikant höheren HDAC Expressionen identifiziert werden, was Einfluss auf die Wirkung und Anwendung von HDAC-Inhibitoren haben könnte und einen zusätzlichen diagnostischen Marker darstellen könnte (eingereicht: Dransfeld, *et al.* 2010).

Die Analyse nicht synonymmer SNPs (nsSNPs) in Klasse I HDACs mit putativer Funktion bei Anfälligkeit für AML deckte nsSNPs als Falschpositive auf und zeigte, dass sie in den hoch konservierten HDACs in Kaukasiern nicht existieren (Dransfeld, *et al.* 2007). Die Analyse der zwei validierten nsSNPs von SIRT3, welches in allen analysierten AML Proben als hochreguliert aufgedeckt wurde, zeigte, dass sie keinen Einfluss auf Aktivität, zelluläre Funktionen im Energiemetabolismus oder die SIRT3 Stabilität, für deren Halbwertszeit diese Studie erste Hinweise lieferte, aufweisen (Dransfeld, *et al.*).

Im Kontext der Optimierung und Individualisierung der Ara-C Therapie konnte mit dem Cytidin Deaminase SNP C-451T ein neuer, signifikanter, unabhängiger prognostischer Überlebens-Marker für AML Patienten aufgedeckt werden (Mahlknecht, *et al.* 2009).

**Abstract**

Missregulation of Histone deacetylases (HDACs) is considered as a crucial event in acute myeloid leukemia (*AML*) *pathogenesis* and therefore the basis for innovative epigenetic treatment strategies, whereby HDAC-inhibitors takes part of these new therapeutic strategies.

With our AML subtype specific gene expression analyses of HDACs we could reveal subtype specific HDAC expression patterns, with AML M1 representing a subtype with significant higher HDAC expression levels, which could hardly affect the impact of HDACi-therapy and present an additional diagnostic marker of AML subtypes (submitted: Dransfeld, *et al.* 2010).

Concerning putative functions of class I HDAC nsSNPs in susceptibility to AML our analyses showed that there actually do not exist any class I HDAC nsSNPs in Caucasians (Dransfeld, *et al* 2007). By analysing two nsSNPs of SIRT3, which was over expressed in all analysed AML probes, it was shown that they had no influence on SIRT3 activity, cellular functions in energy metabolism or stability, which was defined for the first time in this study (Dransfeld, *et al*).

Finally, in the context of optimization of Ara-C standard therapy, this work leads to the identification of cytidine deaminase SNP C-451T as a new, significant, independent prognostic factor for survival of AML patient treated with Ara-C, which further prompts the need for individualized adjusted chemotherapy in patients who are being given Ara-C or other nucleoside analogs (Mahlknecht, *et al* 2009).

## 6 Literaturverzeichnis

- Ahn, B.H., Kim, H.S., Song, S., Lee, I.H., Liu, J., Vassilopoulos, A., Deng, C.X. & Finkel, T. (2008) A role for the mitochondrial deacetylase Sirt3 in regulating energy homeostasis. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 14447-14452.
- Alberts, B., Johnson, A., Lewis, J., Raff, M., Roberts, K. & Walter, P. (2004) Molekularbiologie der Zelle. *VCH-Verlag*.
- Allali-Hassani, A., Wasney, G.A., Chau, I., Hong, B.S., Senisterra, G., Loppnau, P., Shi, Z., Moul, J., Edwards, A.M., Arrowsmith, C.H., Park, H.W., Schapira, M. & Vedadi, M. (2009) A survey of proteins encoded by non-synonymous single nucleotide polymorphisms reveals a significant fraction with altered stability and activity. *Biochem J*, **424**, 15-26.
- Alland, L., Muhle, R., Hou, H., Jr., Potes, J., Chin, L., Schreiber-Agus, N. & DePinho, R.A. (1997) Role for N-CoR and histone deacetylase in Sin3-mediated transcriptional repression. *Nature*, **387**, 49-55.
- Allison, S.J. & Milner, J. (2007) SIRT3 is pro-apoptotic and participates in distinct basal apoptotic pathways. *Cell Cycle*, **6**, 2669-2677.
- Amann, J.M., Nip, J., Strom, D.K., Lutterbach, B., Harada, H., Lenny, N., Downing, J.R., Meyers, S. & Hiebert, S.W. (2001) ETO, a target of t(8;21) in acute leukemia, makes distinct contacts with multiple histone deacetylases and binds mSin3A through its oligomerization domain. *Mol Cell Biol*, **21**, 6470-6483.
- Amat, R., Solanes, G., Giralt, M. & Villarroya, F. (2007) SIRT1 is involved in glucocorticoid-mediated control of uncoupling protein-3 gene transcription. *J Biol Chem*, **282**, 34066-34076.
- Amici, A., Emanuelli, M., Magni, G., Raffaelli, N. & Ruggieri, S. (1997) Pyrimidine nucleotidases from human erythrocyte possess phosphotransferase activities specific for pyrimidine nucleotides. *FEBS Lett*, **419**, 263-267.
- Aparna, G., Bhuyan, A.K., Sahdev, S., Hasnain, S.E., Kaufman, R.J. & Ramaiah, K.V. (2003) Stress-induced apoptosis in *Spodoptera frugiperda* (Sf9) cells: baculovirus p35 mitigates eIF2 alpha phosphorylation. *Biochemistry*, **42**, 15352-15360.
- Araki, T., Sasaki, Y. & Milbrandt, J. (2004) Increased nuclear NAD biosynthesis and SIRT1 activation prevent axonal degeneration. *Science*, **305**, 1010-1013.
- Arents, G., Burlingame, R.W., Wang, B.C., Love, W.E. & Moudrianakis, E.N. (1991) The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **88**, 10148-10152.
- Ashraf, N., Zino, S., Macintyre, A., Kingsmore, D., Payne, A.P., George, W.D. & Shiels, P.G. (2006) Altered sirtuin expression is associated with node-positive breast cancer. *Br J Cancer*, **95**, 1056-1061.
- Atsumi, A., Tomita, A., Kiyoi, H. & Naoe, T. (2006) Histone deacetylase 3 (HDAC3) is recruited to target promoters by PML-RARalpha as a component of the N-CoR corepressor complex to repress transcription in vivo. *Biochem Biophys Res Commun*, **345**, 1471-1480.
- Balaban, R.S., Nemoto, S. & Finkel, T. (2005) Mitochondria, oxidants, and aging. *Cell*, **120**, 483-495.
- Bali, P., Pranpat, M., Bradner, J., Balasis, M., Fiskus, W., Guo, F., Rocha, K., Kumaraswamy, S., Boyapalle, S., Atadja, P., Seto, E. & Bhalla, K. (2005) Inhibition of histone deacetylase 6 acetylates and disrupts the chaperone function of heat shock protein 90: a novel basis for antileukemia activity of histone deacetylase inhibitors. *J Biol Chem*, **280**, 26729-26734.

- Barnes, M.R. (2002) SNP and mutation data on the web - hidden treasures for uncovering. *Comp Funct Genomics*, **3**, 67-74.
- Barzi, A. & Sekeres, M.A. Myelodysplastic syndromes: a practical approach to diagnosis and treatment. *Cleve Clin J Med*, **77**, 37-44.
- Baylin, S.B. & Herman, J.G. (2000) DNA hypermethylation in tumorigenesis: epigenetics joins genetics. *Trends Genet*, **16**, 168-174.
- Bellizzi, D., Rose, G., Cavalcante, P., Covello, G., Dato, S., De Rango, F., Greco, V., Maggioni, M., Feraco, E., Mari, V., Franceschi, C., Passarino, G. & De Benedictis, G. (2005) A novel VNTR enhancer within the SIRT3 gene, a human homologue of SIR2, is associated with survival at oldest ages. *Genomics*, **85**, 258-263.
- Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H.R. & Sultan, C. (1976) Proposals for the classification of the acute leukaemias. French-American-British (FAB) co-operative group. *Br J Haematol*, **33**, 451-458.
- Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H.R. & Sultan, C. (1985) Criteria for the diagnosis of acute leukemia of megakaryocyte lineage (M7). A report of the French-American-British Cooperative Group. *Ann Intern Med*, **103**, 460-462.
- Bennett, J.M., Catovsky, D., Daniel, M.T., Flandrin, G., Galton, D.A., Gralnick, H.R. & Sultan, C. (1991) Proposal for the recognition of minimally differentiated acute myeloid leukaemia (AML-MO). *Br J Haematol*, **78**, 325-329.
- Bernard, J., Boiron, M., Jacquillat, C., Weil, M. & Najean, Y. (1966) [A new agent active in the treatment of acute leukemia: cytosine arabinoside]. *Presse Med*, **74**, 799-802.
- Betts, L., Xiang, S., Short, S.A., Wolfenden, R. & Carter, C.W., Jr. (1994) Cytidine deaminase. The 2.3 Å crystal structure of an enzyme: transition-state analog complex. *J Mol Biol*, **235**, 635-656.
- Bhatla, D., Gerbing, R.B., Alonzo, T.A., Conner, H., Ross, J.A., Meshinchi, S., Zhai, X., Zamzow, T., Mehta, P.A., Geiger, H., Perentesis, J. & Davies, S.M. (2009) Cytidine deaminase genotype and toxicity of cytosine arabinoside therapy in children with acute myeloid leukemia. *Br J Haematol*, **144**, 388-394.
- Biel, M., Wascholowski, V. & Giannis, A. (2005) Epigenetics--an epicenter of gene regulation: histones and histone-modifying enzymes. *Angew Chem Int Ed Engl*, **44**, 3186-3216.
- Birnboim, H.C. & Doly, J. (1979) A rapid alkaline extraction procedure for screening recombinant plasmid DNA. *Nucleic Acids Res*, **7**, 1513-1523.
- Bishton, M., Kenealy, M., Johnstone, R., Rasheed, W. & Prince, H.M. (2007) Epigenetic targets in hematological malignancies: combination therapies with HDACis and demethylating agents. *Expert Rev Anticancer Ther*, **7**, 1439-1449.
- Bitterman, K.J., Anderson, R.M., Cohen, H.Y., Latorre-Esteves, M. & Sinclair, D.A. (2002) Inhibition of silencing and accelerated aging by nicotinamide, a putative negative regulator of yeast sir2 and human SIRT1. *J Biol Chem*, **277**, 45099-45107.
- Blackwell, L., Norris, J., Suto, C.M. & Janzen, W.P. (2008) The use of diversity profiling to characterize chemical modulators of the histone deacetylases. *Life Sci*, **82**, 1050-1058.
- Blander, G. & Guarente, L. (2004) The Sir2 family of protein deacetylases. *Annu Rev Biochem*, **73**, 417-435.
- Blum, W. & Marcucci, G. (2005) Targeting epigenetic changes in acute myeloid leukemia. *Clin Adv Hematol Oncol*, **3**, 855-865, 882.
- Bolden, J.E., Peart, M.J. & Johnstone, R.W. (2006) Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*, **5**, 769-784.
- Bordone, L., Motta, M.C., Picard, F., Robinson, A., Jhala, U.S., Apfeld, J., McDonagh, T., Lemieux, M., McBurney, M., Szilvasi, A., Easlon, E.J., Lin, S.J. & Guarente, L.

- (2006) Sirt1 regulates insulin secretion by repressing UCP2 in pancreatic beta cells. *PLoS Biol*, **4**, e31.
- Bota, D.A. & Davies, K.J. (2001) Protein degradation in mitochondria: implications for oxidative stress, aging and disease: a novel etiological classification of mitochondrial proteolytic disorders. *Mitochondrion*, **1**, 33-49.
- Botrugno, O.A., Santoro, F. & Minucci, S. (2009) Histone deacetylase inhibitors as a new weapon in the arsenal of differentiation therapies of cancer. *Cancer Lett*, **280**, 134-144.
- Brachmann, C.B., Sherman, J.M., Devine, S.E., Cameron, E.E., Pillus, L. & Boeke, J.D. (1995) The SIR2 gene family, conserved from bacteria to humans, functions in silencing, cell cycle progression, and chromosome stability. *Genes Dev*, **9**, 2888-2902.
- Bradbury, C.A., Khanim, F.L., Hayden, R., Bunce, C.M., White, D.A., Drayson, M.T., Craddock, C. & Turner, B.M. (2005) Histone deacetylases in acute myeloid leukaemia show a distinctive pattern of expression that changes selectively in response to deacetylase inhibitors. *Leukemia*, **19**, 1751-1759.
- Brunet, A., Sweeney, L.B., Sturgill, J.F., Chua, K.F., Greer, P.L., Lin, Y., Tran, H., Ross, S.E., Mostoslavsky, R., Cohen, H.Y., Hu, L.S., Cheng, H.L., Jedrychowski, M.P., Gygi, S.P., Sinclair, D.A., Alt, F.W. & Greenberg, M.E. (2004) Stress-dependent regulation of FOXO transcription factors by the SIRT1 deacetylase. *Science*, **303**, 2011-2015.
- Bruserud, O., Stapnes, C., Ersvaer, E., Gjertsen, B.T. & Rynningen, A. (2007) Histone deacetylase inhibitors in cancer treatment: a review of the clinical toxicity and the modulation of gene expression in cancer cell. *Curr Pharm Biotechnol*, **8**, 388-400.
- Bruserud, O., Stapnes, C., Tronstad, K.J., Rynningen, A., Anensen, N. & Gjertsen, B.T. (2006) Protein lysine acetylation in normal and leukaemic haematopoiesis: HDACs as possible therapeutic targets in adult AML. *Expert Opin Ther Targets*, **10**, 51-68.
- Buchwald, M., Kramer, O.H. & Heinzl, T. (2009) HDACi--targets beyond chromatin. *Cancer Lett*, **280**, 160-167.
- Butler, L.M., Zhou, X., Xu, W.S., Scher, H.I., Rifkind, R.A., Marks, P.A. & Richon, V.M. (2002) The histone deacetylase inhibitor SAHA arrests cancer cell growth, up-regulates thioredoxin-binding protein-2, and down-regulates thioredoxin. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 11700-11705.
- Byrd, J.C., Mrozek, K., Dodge, R.K., Carroll, A.J., Edwards, C.G., Arthur, D.C., Pettenati, M.J., Patil, S.R., Rao, K.W., Watson, M.S., Koduru, P.R., Moore, J.O., Stone, R.M., Mayer, R.J., Feldman, E.J., Davey, F.R., Schiffer, C.A., Larson, R.A. & Bloomfield, C.D. (2002) Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood*, **100**, 4325-4336.
- Cameron, E.E., Bachman, K.E., Myohanen, S., Herman, J.G. & Baylin, S.B. (1999) Synergy of demethylation and histone deacetylase inhibition in the re-expression of genes silenced in cancer. *Nat Genet*, **21**, 103-107.
- Capizzi, R.L., Yang, J.L., Cheng, E., Bjornsson, T., Sahasrabudhe, D., Tan, R.S. & Cheng, Y.C. (1983) Alteration of the pharmacokinetics of high-dose ara-C by its metabolite, high ara-U in patients with acute leukemia. *J Clin Oncol*, **1**, 763-771.
- Carew, J.S., Giles, F.J. & Nawrocki, S.T. (2008) Histone deacetylase inhibitors: mechanisms of cell death and promise in combination cancer therapy. *Cancer Lett*, **269**, 7-17.
- Cargill, M., Altshuler, D., Ireland, J., Sklar, P., Ardlie, K., Patil, N., Shaw, N., Lane, C.R., Lim, E.P., Kalyanaraman, N., Nemesh, J., Ziaugra, L., Friedland, L., Rolfe, A., Warrington, J., Lipshutz, R., Daley, G.Q. & Lander, E.S. (1999) Characterization of sin-

- gle-nucleotide polymorphisms in coding regions of human genes. *Nat Genet*, **22**, 231-238.
- Cass, C.E., Young, J.D. & Baldwin, S.A. (1998) Recent advances in the molecular biology of nucleoside transporters of mammalian cells. *Biochem Cell Biol*, **76**, 761-770.
- Cerioti, L., Kob, A., Drechsler, S., Ponti, J., Thedinga, E., Colpo, P., Ehret, R. & Rossi, F. (2007) Online monitoring of BALB/3T3 metabolism and adhesion with multiparametric chip-based system. *Anal Biochem*, **371**, 92-104.
- Chabner, B.A., Hande, K.R. & Drake, J.C. (1979) Ara-C metabolism: implications for drug resistance and drug interactions. *Bull Cancer*, **66**, 89-92.
- Chabner, B.A. & Longo, D.L. (1969) Cytidine analogues. In: Cancer chemotherapy and biotherapy-principles and practice. 213-234.
- Chan, D.C. (2006) Mitochondria: dynamic organelles in disease, aging, and development. *Cell*, **125**, 1241-1252.
- Chaudhary, N. & Pfluger, P.T. (2009) Metabolic benefits from Sirt1 and Sirt1 activators. *Curr Opin Clin Nutr Metab Care*, **12**, 431-437.
- Chuang, R.Y. & Chuang, L.F. (1976) Inhibition of RNA polymerase as a possible anti-leukaemic action of cytosine arabinoside. *Nature*, **260**, 549-550.
- Chung, S.Y., Hill, W.E. & Doty, P. (1978) Characterization of the histone core complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **75**, 1680-1684.
- Cimen, H., Han, M.J., Yang, Y., Tong, Q., Koc, H. & Koc, E.C. Regulation of succinate dehydrogenase activity by SIRT3 in mammalian mitochondria. *Biochemistry*, **49**, 304-311.
- Claus, R., Almstedt, M. & Lubbert, M. (2005) Epigenetic treatment of hematopoietic malignancies: in vivo targets of demethylating agents. *Semin Oncol*, **32**, 511-520.
- Cohen, H.Y., Miller, C., Bitterman, K.J., Wall, N.R., Hekking, B., Kessler, B., Howitz, K.T., Gorospe, M., de Cabo, R. & Sinclair, D.A. (2004) Calorie restriction promotes mammalian cell survival by inducing the SIRT1 deacetylase. *Science*, **305**, 390-392.
- Coleman, C.N., Stoller, R.G., Drake, J.C. & Chabner, B.A. (1975) Deoxycytidine kinase: properties of the enzyme from human leukemic granulocytes. *Blood*, **46**, 791-803.
- Collins, F.S., Brooks, L.D. & Chakravarti, A. (1998) A DNA polymorphism discovery resource for research on human genetic variation. *Genome Res*, **8**, 1229-1231.
- Colly, L.P., Peters, W.G., Richel, D., Arentsen-Honders, M.W., Starrenburg, C.W. & Willemze, R. (1987) Deoxycytidine kinase and deoxycytidine deaminase values correspond closely to clinical response to cytosine arabinoside remission induction therapy in patients with acute myelogenous leukemia. *Semin Oncol*, **14**, 257-261.
- Cozzio, A., Passegue, E., Ayton, P.M., Karsunky, H., Cleary, M.L. & Weissman, I.L. (2003) Similar MLL-associated leukemias arising from self-renewing stem cells and short-lived myeloid progenitors. *Genes Dev*, **17**, 3029-3035.
- Cress, W.D. & Seto, E. (2000) Histone deacetylases, transcriptional control, and cancer. *J Cell Physiol*, **184**, 1-16.
- Cros, E., Jordheim, L., Dumontet, C. & Galmarini, C.M. (2004) Problems related to resistance to cytarabine in acute myeloid leukemia. *Leuk Lymphoma*, **45**, 1123-1132.
- Dali-Youcef, N., Lagouge, M., Froelich, S., Koehl, C., Schoonjans, K. & Auwerx, J. (2007) Sirtuins: the 'magnificent seven', function, metabolism and longevity. *Ann Med*, **39**, 335-345.
- Dash, A. & Gilliland, D.G. (2001) Molecular genetics of acute myeloid leukaemia. *Best Pract Res Clin Haematol*, **14**, 49-64.
- Dastugue, N., Payen, C., Lafage-Pochitaloff, M., Bernard, P., Leroux, D., Huguet-Rigal, F., Stoppa, A.M., Marit, G., Molina, L., Michallet, M. & et al. (1995) Prognostic significance of karyotype in de novo adult acute myeloid leukemia. The BGMT group. *Leukemia*, **9**, 1491-1498.

- De La Vega, F.M., Dailey, D., Ziegler, J., Williams, J., Madden, D. & Gilbert, D.A. (2002) New generation pharmacogenomic tools: a SNP linkage disequilibrium Map, validated SNP assay resource, and high-throughput instrumentation system for large-scale genetic studies. *Biotechniques*, **Suppl**, 48-50, 52, 54.
- de Nigris, F., Cerutti, J., Morelli, C., Califano, D., Chiariotti, L., Viglietto, G., Santelli, G. & Fusco, A. (2002) Isolation of a SIR-like gene, SIR-T8, that is overexpressed in thyroid carcinoma cell lines and tissues. *Br J Cancer*, **86**, 917-923.
- DeAngelis, L.M., Kreis, W., Chan, K., Dantis, E. & Akerman, S. (1992) Pharmacokinetics of ara-C and ara-U in plasma and CSF after high-dose administration of cytosine arabinoside. *Cancer Chemother Pharmacol*, **29**, 173-177.
- Delforge, M. (2003) Understanding the pathogenesis of myelodysplastic syndromes. *Hematol J*, **4**, 303-309.
- Demontis, S., Terao, M., Brivio, M., Zanotta, S., Bruschi, M. & Garattini, E. (1998) Isolation and characterization of the gene coding for human cytidine deaminase. *Biochim Biophys Acta*, **1443**, 323-333.
- Deroanne, C.F., Bonjean, K., Servotte, S., Devy, L., Colige, A., Clause, N., Blacher, S., Verdin, E., Foidart, J.M., Nusgens, B.V. & Castronovo, V. (2002) Histone deacetylases inhibitors as anti-angiogenic agents altering vascular endothelial growth factor signaling. *Oncogene*, **21**, 427-436.
- Di Gennaro, E., Bruzzese, F., Caraglia, M., Abruzzese, A. & Budillon, A. (2004) Acetylation of proteins as novel target for antitumor therapy: review article. *Amino Acids*, **26**, 435-441.
- Dokmanovic, M., Clarke, C. & Marks, P.A. (2007) Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives. *Mol Cancer Res*, **5**, 981-989.
- Dransfeld, C.L., Alborzina, H., Wolfl, S. & Mahlknecht, U. SIRT3 SNPs validation in 640 individuals, functional analyses and new insights into SIRT3 stability. *Int J Oncol*, **36**, 955-960.
- Dransfeld, C.L., Schaich, M., Ho, A.D., Thiede, C., Ehninger, G. & Mahlknecht, U. (2007) Class I HDAC SNP analysis in healthy donors compared to AML patients. *Leukemia*, **21**, 1587-1590.
- Dryden, S.C., Nahhas, F.A., Nowak, J.E., Goustin, A.S. & Tainsky, M.A. (2003) Role for human SIRT2 NAD-dependent deacetylase activity in control of mitotic exit in the cell cycle. *Mol Cell Biol*, **23**, 3173-3185.
- Durst, K.L., Lutterbach, B., Kummalu, T., Friedman, A.D. & Hiebert, S.W. (2003) The inv(16) fusion protein associates with corepressors via a smooth muscle myosin heavy-chain domain. *Mol Cell Biol*, **23**, 607-619.
- Early, A.P., Preisler, H.D., Slocum, H. & Rustum, Y.M. (1982) A pilot study of high-dose 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine for acute leukemia and refractory lymphoma: clinical response and pharmacology. *Cancer Res*, **42**, 1587-1594.
- Ehninger, G., Link, H. & Berdel, W.E. (2008a) *Akute myeloische Leukaemie - Pathophysiologie, Diagnostik, Therapie, Prognose*.
- Ehninger, G., Link, H., Berdel, W.E., Froschinsky, F., Wandt, H., Schaich, M., Neubauer, A., Illmer, T., Baldus, C.D., Thiel, E., Mahlknecht, U., Thiede, C. & Müller-Tidow, C. (2008b) *Akute myeloische Leukaemie - Pathophysiologie, Diagnostik, Therapie, Prognose*.
- Ehret, R., Baumann, W., Brischwein, M., Lehmann, M., Henning, T., Freund, I., Drechsler, S., Friedrich, U., Hubert, M.L., Motrescu, E., Kob, A., Palzer, H., Grothe, H. & Wolf, B. (2001) Multiparametric microsensor chips for screening applications. *Fresenius J Anal Chem*, **369**, 30-35.
- Ekwall, K. (2005) Genome-wide analysis of HDAC function. *Trends Genet*, **21**, 608-615.

- Ellis, L., Hammers, H. & Pili, R. (2009) Targeting tumor angiogenesis with histone deacetylase inhibitors. *Cancer Lett*, **280**, 145-153.
- Emiliani, S., Fischle, W., Van Lint, C., Al-Abed, Y. & Verdin, E. (1998) Characterization of a human RPD3 ortholog, HDAC3. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 2795-2800.
- Escamilla-Powers, J.R. & Sears, R.C. (2007) A conserved pathway that controls c-Myc protein stability through opposing phosphorylation events occurs in yeast. *J Biol Chem*, **282**, 5432-5442.
- Evans, W.E. & McLeod, H.L. (2003) Pharmacogenomics--drug disposition, drug targets, and side effects. *N Engl J Med*, **348**, 538-549.
- Falini, B., Mecucci, C., Tiacci, E., Alcalay, M., Rosati, R., Pasqualucci, L., La Starza, R., Diverio, D., Colombo, E., Santucci, A., Bigerna, B., Pacini, R., Pucciarini, A., Liso, A., Vignetti, M., Fazi, P., Meani, N., Pettrossi, V., Saglio, G., Mandelli, F., Lo-Coco, F., Pelicci, P.G. & Martelli, M.F. (2005) Cytoplasmic nucleophosmin in acute myelogenous leukemia with a normal karyotype. *N Engl J Med*, **352**, 254-266.
- Figueroa, M.E., Lugthart, S., Li, Y., Erpelinck-Verschueren, C., Deng, X., Christos, P.J., Schifano, E., Booth, J., van Putten, W., Skrabanek, L., Campagne, F., Mazumdar, M., Grealley, J.M., Valk, P.J., Lowenberg, B., Delwel, R. & Melnick, A. DNA Methylation Signatures Identify Biologically Distinct Subtypes in Acute Myeloid Leukemia. *Cancer Cell*.
- Finnin, M.S., Donigian, J.R., Cohen, A., Richon, V.M., Rifkind, R.A., Marks, P.A., Breslow, R. & Pavletich, N.P. (1999) Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature*, **401**, 188-193.
- Fischer, D.D., Cai, R., Bhatia, U., Asselbergs, F.A., Song, C., Terry, R., Trogani, N., Widmer, R., Atadja, P. & Cohen, D. (2002) Isolation and characterization of a novel class II histone deacetylase, HDAC10. *J Biol Chem*, **277**, 6656-6666.
- Fischle, W., Dequiedt, F., Fillion, M., Hendzel, M.J., Voelter, W. & Verdin, E. (2001) Human HDAC7 histone deacetylase activity is associated with HDAC3 in vivo. *J Biol Chem*, **276**, 35826-35835.
- Fischle, W., Emiliani, S., Hendzel, M.J., Nagase, T., Nomura, N., Voelter, W. & Verdin, E. (1999) A new family of human histone deacetylases related to *Saccharomyces cerevisiae* HDA1p. *J Biol Chem*, **274**, 11713-11720.
- Fitzgerald, S.M., Goyal, R.K., Osborne, W.R., Roy, J.D., Wilson, J.W. & Ferrell, R.E. (2006) Identification of functional single nucleotide polymorphism haplotypes in the cytidine deaminase promoter. *Hum Genet*, **119**, 276-283.
- Ford, J., Ahmed, S., Allison, S., Jiang, M. & Milner, J. (2008) JNK2-dependent regulation of SIRT1 protein stability. *Cell Cycle*, **7**, 3091-3097.
- Ford, J., Jiang, M. & Milner, J. (2005) Cancer-specific functions of SIRT1 enable human epithelial cancer cell growth and survival. *Cancer Res*, **65**, 10457-10463.
- Frescas, D., Valenti, L. & Accili, D. (2005) Nuclear trapping of the forkhead transcription factor FoxO1 via Sirt-dependent deacetylation promotes expression of glucogenic genes. *J Biol Chem*, **280**, 20589-20595.
- Frye, R. (2002) "SIRT8" expressed in thyroid cancer is actually SIRT7. *Br J Cancer*, **87**, 1479.
- Frye, R.A. (2000) Phylogenetic classification of prokaryotic and eukaryotic Sir2-like proteins. *Biochem Biophys Res Commun*, **273**, 793-798.
- Fulco, M., Schiltz, R.L., Iezzi, S., King, M.T., Zhao, P., Kashiwaya, Y., Hoffman, E., Veech, R.L. & Sartorelli, V. (2003) Sir2 regulates skeletal muscle differentiation as a potential sensor of the redox state. *Mol Cell*, **12**, 51-62.
- Furth, J.J. & Cohen, S.S. (1968) Inhibition of mammalian DNA polymerase by the 5'-triphosphate of 1-beta-d-arabinofuranosylcytosine and the 5'-triphosphate of 9-beta-d-arabinofuranoxyladenine. *Cancer Res*, **28**, 2061-2067.

- Galm, O., Herman, J.G. & Baylin, S.B. (2006) The fundamental role of epigenetics in hematopoietic malignancies. *Blood Rev*, **20**, 1-13.
- Galmarini, C.M., Mackey, J.R. & Dumontet, C. (2001) Nucleoside analogues: mechanisms of drug resistance and reversal strategies. *Leukemia*, **15**, 875-890.
- Gao, L., Cueto, M.A., Asselbergs, F. & Atadja, P. (2002) Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. *J Biol Chem*, **277**, 25748-25755.
- Gatta, G., Capocaccia, R., Stiller, C., Kaatsch, P., Berrino, F. & Terenziani, M. (2005) Childhood cancer survival trends in Europe: a EURO CARE Working Group study. *J Clin Oncol*, **23**, 3742-3751.
- Ge, Y., Jensen, T.L., Stout, M.L., Flatley, R.M., Grohar, P.J., Ravindranath, Y., Matherly, L.H. & Taub, J.W. (2004) The role of cytidine deaminase and GATA1 mutations in the increased cytosine arabinoside sensitivity of Down syndrome myeloblasts and leukemia cell lines. *Cancer Res*, **64**, 728-735.
- Ge, Y., Stout, M.L., Tatman, D.A., Jensen, T.L., Buck, S., Thomas, R.L., Ravindranath, Y., Matherly, L.H. & Taub, J.W. (2005) GATA1, cytidine deaminase, and the high cure rate of Down syndrome children with acute megakaryocytic leukemia. *J Natl Cancer Inst*, **97**, 226-231.
- Gilbert, J.A., Salavaggione, O.E., Ji, Y., Pelley Mounter, L.L., Eckloff, B.W., Wieben, E.D., Ames, M.M. & Weinshilboum, R.M. (2006) Gemcitabine pharmacogenomics: cytidine deaminase and deoxycytidylate deaminase gene resequencing and functional genomics. *Clin Cancer Res*, **12**, 1794-1803.
- Gilliland, D.G. (1998) Molecular genetics of human leukemia. *Leukemia*, **12 Suppl 1**, S7-12.
- Gilliland, D.G. & Griffin, J.D. (2002) Role of FLT3 in leukemia. *Curr Opin Hematol*, **9**, 274-281.
- Gilliland, D.G. & Tallman, M.S. (2002) Focus on acute leukemias. *Cancer Cell*, **1**, 417-420.
- Giovannetti, E., Laan, A.C., Vasile, E., Tibaldi, C., Nannizzi, S., Ricciardi, S., Falcone, A., Danesi, R. & Peters, G.J. (2008) Correlation between cytidine deaminase genotype and gemcitabine deamination in blood samples. *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **27**, 720-725.
- Glaser, K.B., Staver, M.J., Waring, J.F., Stender, J., Ulrich, R.G. & Davidsen, S.K. (2003) Gene expression profiling of multiple histone deacetylase (HDAC) inhibitors: defining a common gene set produced by HDAC inhibition in T24 and MDA carcinoma cell lines. *Mol Cancer Ther*, **2**, 151-163.
- Glozak, M.A. & Seto, E. (2007) Histone deacetylases and cancer. *Oncogene*, **26**, 5420-5432.
- Goel, A., Arnold, C.N., Tassone, P., Chang, D.K., Niedzwiecki, D., Dowell, J.M., Wasserman, L., Compton, C., Mayer, R.J., Bertagnolli, M.M. & Boland, C.R. (2004) Epigenetic inactivation of RUNX3 in microsatellite unstable sporadic colon cancers. *Int J Cancer*, **112**, 754-759.
- Graham, F.L., Smiley, J., Russell, W.C. & Nairn, R. (1977) Characteristics of a human cell line transformed by DNA from human adenovirus type 5. *J Gen Virol*, **36**, 59-74.
- Gramatzki, M., Ludwig, W.D., Burger, R., Moos, P., Rohwer, P., Grunert, C., Sandler, A., Kalden, J.R., Andreesen, R., Henschke, F. & Moldenhauer, G. (1998) Antibodies TC-12 ("unique") and TH-111 (CD96) characterize T-cell acute lymphoblastic leukemia and a subgroup of acute myeloid leukemia. *Exp Hematol*, **26**, 1209-1214.
- Gray, S.G. & De Meyts, P. (2005) Role of histone and transcription factor acetylation in diabetes pathogenesis. *Diabetes Metab Res Rev*, **21**, 416-433.
- Gregoret, I.V., Lee, Y.M. & Goodson, H.V. (2004) Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *J Mol Biol*, **338**, 17-31.

- Gregory, M.A. & Hann, S.R. (2000) c-Myc proteolysis by the ubiquitin-proteasome pathway: stabilization of c-Myc in Burkitt's lymphoma cells. *Mol Cell Biol*, **20**, 2423-2435.
- Grignani, F., Valtieri, M., Gabbianelli, M., Gelmetti, V., Botta, R., Luchetti, L., Masella, B., Morsilli, O., Pelosi, E., Samoggia, P., Pelicci, P.G. & Peschle, C. (2000) PML/RAR alpha fusion protein expression in normal human hematopoietic progenitors dictates myeloid commitment and the promyelocytic phenotype. *Blood*, **96**, 1531-1537.
- Grimwade, D., Walker, H., Oliver, F., Wheatley, K., Harrison, C., Harrison, G., Rees, J., Hann, I., Stevens, R., Burnett, A. & Goldstone, A. (1998) The importance of diagnostic cytogenetics on outcome in AML: analysis of 1,612 patients entered into the MRC AML 10 trial. The Medical Research Council Adult and Children's Leukaemia Working Parties. *Blood*, **92**, 2322-2333.
- Grozinger, C.M., Hassig, C.A. & Schreiber, S.L. (1999) Three proteins define a class of human histone deacetylases related to yeast Hda1p. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **96**, 4868-4873.
- Grunstein, M. (1997) Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature*, **389**, 349-352.
- Guardiola, A.R. & Yao, T.P. (2002) Molecular cloning and characterization of a novel histone deacetylase HDAC10. *J Biol Chem*, **277**, 3350-3356.
- Haberland, M., Arnold, M.A., McAnally, J., Phan, D., Kim, Y. & Olson, E.N. (2007) Regulation of HDAC9 gene expression by MEF2 establishes a negative-feedback loop in the transcriptional circuitry of muscle differentiation. *Mol Cell Biol*, **27**, 518-525.
- Haferlach, T., Kern, W., Schoch, C., Schnittger, S., Sauerland, M.C., Heinecke, A., Buchner, T. & Hiddemann, W. (2004) A new prognostic score for patients with acute myeloid leukemia based on cytogenetics and early blast clearance in trials of the German AML Cooperative Group. *Haematologica*, **89**, 408-418.
- Haggarty, S.J., Koeller, K.M., Wong, J.C., Grozinger, C.M. & Schreiber, S.L. (2003) Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **100**, 4389-4394.
- Haigis, M.C., Mostoslavsky, R., Haigis, K.M., Fahie, K., Christodoulou, D.C., Murphy, A.J., Valenzuela, D.M., Yancopoulos, G.D., Karow, M., Blander, G., Wolberger, C., Prolla, T.A., Weindruch, R., Alt, F.W. & Guarente, L. (2006) SIRT4 inhibits glutamate dehydrogenase and opposes the effects of calorie restriction in pancreatic beta cells. *Cell*, **126**, 941-954.
- Hallows, W.C., Lee, S. & Denu, J.M. (2006) Sirtuins deacetylate and activate mammalian acetyl-CoA synthetases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 10230-10235.
- Harlos, M., Ott, I., Gust, R., Alborzinia, H., Wolfl, S., Kromm, A. & Sheldrick, W.S. (2008) Synthesis, biological activity, and structure-activity relationships for potent cytotoxic rhodium(III) polypyridyl complexes. *J Med Chem*, **51**, 3924-3933.
- Harousseau, J.L., Reiffers, J., Hurteloup, P., Milpied, N., Guy, H., Rigal-Huguet, F., Facon, T., Dufour, P. & Ifrah, N. (1989) Treatment of relapsed acute myeloid leukemia with idarubicin and intermediate-dose cytarabine. *J Clin Oncol*, **7**, 45-49.
- Harris, A.L. & Grahame-Smith, D.G. (1982) The relationship of Ara-C metabolism in vitro to therapeutic response in acute myeloid leukaemia. *Cancer Chemother Pharmacol*, **9**, 30-35.
- Heinzel, T., Lavinsky, R.M., Mullen, T.M., Soderstrom, M., Laherty, C.D., Torchia, J., Yang, W.M., Brard, G., Ngo, S.D., Davie, J.R., Seto, E., Eisenman, R.N., Rose, D.W., Glass, C.K. & Rosenfeld, M.G. (1997) A complex containing N-CoR, mSin3 and histone deacetylase mediates transcriptional repression. *Nature*, **387**, 43-48.
- Hellenbrecht, A., Messerer, N. & Gokbuget, N. (2003) Häufigkeit von Leukämien bei Erwachsenen in Deutschland. [http://www.kompetenznetz-leukaemie.de/kn\\_home/InfoAerzte/epidemiologie.html](http://www.kompetenznetz-leukaemie.de/kn_home/InfoAerzte/epidemiologie.html).

- Hideshima, T., Bradner, J.E., Wong, J., Chauhan, D., Richardson, P., Schreiber, S.L. & Anderson, K.C. (2005) Small-molecule inhibition of proteasome and aggresome function induces synergistic antitumor activity in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 8567-8572.
- Hiratsuka, M., Inoue, T., Toda, T., Kimura, N., Shirayoshi, Y., Kamitani, H., Watanabe, T., Ohama, E., Tahimic, C.G., Kurimasa, A. & Oshimura, M. (2003) Proteomics-based identification of differentially expressed genes in human gliomas: down-regulation of SIRT2 gene. *Biochem Biophys Res Commun*, **309**, 558-566.
- Ho, D.H. & Frei, E., 3rd (1971) Clinical pharmacology of 1-beta-d-arabinofuranosyl cytosine. *Clin Pharmacol Ther*, **12**, 944-954.
- Horner, M.J., Ries, L.A.G., Krapcho, M., Neyman, N., Aminou, R., Howlader, N., Altekruse, S.F., Feuer, E.J., Huang, L., Mariotto, A., Miller, B.A., Lewis, D.R., Eisner, M.P., Stinchcomb, D.G. & Edwards, B.K. (2009) SEER Cancer Statistics Review 1975-2006. *National Cancer Institute. Bethesda*, [http://seer.cancer.gov/csr/1975\\_2006/](http://seer.cancer.gov/csr/1975_2006/).
- Hu, E., Chen, Z., Fredrickson, T., Zhu, Y., Kirkpatrick, R., Zhang, G.F., Johanson, K., Sung, C.M., Liu, R. & Winkler, J. (2000) Cloning and characterization of a novel human class I histone deacetylase that functions as a transcription repressor. *J Biol Chem*, **275**, 15254-15264.
- Hubbert, C., Guardiola, A., Shao, R., Kawaguchi, Y., Ito, A., Nixon, A., Yoshida, M., Wang, X.F. & Yao, T.P. (2002) HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature*, **417**, 455-458.
- Hubeek, I., Stam, R.W., Peters, G.J., Broekhuizen, R., Meijerink, J.P., van Wering, E.R., Gibson, B.E., Creutzig, U., Zwaan, C.M., Cloos, J., Kuik, D.J., Pieters, R. & Kaspers, G.J. (2005) The human equilibrative nucleoside transporter 1 mediates in vitro cytarabine sensitivity in childhood acute myeloid leukaemia. *Br J Cancer*, **93**, 1388-1394.
- Huffman, D.M., Grizzle, W.E., Bamman, M.M., Kim, J.S., Eltoum, I.A., Elgavish, A. & Nagy, T.R. (2007) SIRT1 is significantly elevated in mouse and human prostate cancer. *Cancer Res*, **67**, 6612-6618.
- Illmer, T., Schuler, U.S., Thiede, C., Schwarz, U.I., Kim, R.B., Gotthard, S., Freund, D., Schakel, U., Ehniger, G. & Schaich, M. (2002) MDR1 gene polymorphisms affect therapy outcome in acute myeloid leukemia patients. *Cancer Res*, **62**, 4955-4962.
- Imai, S., Armstrong, C.M., Kaeberlein, M. & Guarente, L. (2000) Transcriptional silencing and longevity protein Sir2 is an NAD-dependent histone deacetylase. *Nature*, **403**, 795-800.
- Imai, T., Adachi, S., Nishijo, K., Ohgushi, M., Okada, M., Yasumi, T., Watanabe, K., Nishikomori, R., Nakayama, T., Yonehara, S., Toguchida, J. & Nakahata, T. (2003) FR901228 induces tumor regression associated with induction of Fas ligand and activation of Fas signaling in human osteosarcoma cells. *Oncogene*, **22**, 9231-9242.
- Insinga, A., Monestiroli, S., Ronzoni, S., Gelmetti, V., Marchesi, F., Viale, A., Altucci, L., Nervi, C., Minucci, S. & Pelicci, P.G. (2005) Inhibitors of histone deacetylases induce tumor-selective apoptosis through activation of the death receptor pathway. *Nat Med*, **11**, 71-76.
- Int.-HapMap-Consortium (2003) The International HapMap Project. *Nature*, **426**, 789-796.
- Ito, A., Kawaguchi, Y., Lai, C.H., Kovacs, J.J., Higashimoto, Y., Appella, E. & Yao, T.P. (2002) MDM2-HDAC1-mediated deacetylation of p53 is required for its degradation. *Embo J*, **21**, 6236-6245.
- Jackson, M.J., Beaudet, A.L. & O'Brien, W.E. (1986) Mammalian urea cycle enzymes. *Annu Rev Genet*, **20**, 431-464.
- Jacobs, K.M., Pennington, J.D., Bisht, K.S., Aykin-Burns, N., Kim, H.S., Mishra, M., Sun, L., Nguyen, P., Ahn, B.H., Leclerc, J., Deng, C.X., Spitz, D.R. & Gius, D. (2008) SIRT3

- interacts with the daf-16 homolog FOXO3a in the mitochondria, as well as increases FOXO3a dependent gene expression. *Int J Biol Sci*, **4**, 291-299.
- Jaffe, E.S., Harris, N.L., Stein, H. & Vardiman, J.W. (2001) World Health Organisation classification of tumors: Pathology and Genetics of tumours of haematopoietic and lymphoid tissues. *Ann Onc*, **13**, 490-491.
- Jamieson, C.H., Weissman, I.L. & Passegue, E. (2004) Chronic versus acute myelogenous leukemia: a question of self-renewal. *Cancer Cell*, **6**, 531-533.
- Jansen, M.S., Nagel, S.C., Miranda, P.J., Lobenhofer, E.K., Afshari, C.A. & McDonnell, D.P. (2004) Short-chain fatty acids enhance nuclear receptor activity through mitogen-activated protein kinase activation and histone deacetylase inhibition. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 7199-7204.
- Jenuwein, T. & Allis, C.D. (2001) Translating the histone code. *Science*, **293**, 1074-1080.
- Jiang, W.J. (2008) Sirtuins: novel targets for metabolic disease in drug development. *Biochem Biophys Res Commun*, **373**, 341-344.
- Joerger, M., Bosch, T.M., Doodeman, V.D., Beijnen, J.H., Smits, P.H. & Schellens, J.H. (2006) Novel deoxycytidine kinase gene polymorphisms: a population screening study in Caucasian healthy volunteers. *Eur J Clin Pharmacol*, **62**, 681-684.
- Johnstone, R.W. (2002) Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nat Rev Drug Discov*, **1**, 287-299.
- Jones, P.A. & Baylin, S.B. (2007) The epigenomics of cancer. *Cell*, **128**, 683-692.
- Jung-Hynes, B., Nihal, M., Zhong, W. & Ahmad, N. (2009) Role of sirtuin histone deacetylase SIRT1 in prostate cancer. A target for prostate cancer management via its inhibition? *J Biol Chem*, **284**, 3823-3832.
- Kalow, W., Tang, B.K. & Endrenyi, L. (1998) Hypothesis: comparisons of inter- and intra-individual variations can substitute for twin studies in drug research. *Pharmacogenetics*, **8**, 283-289.
- Kao, H.Y., Downes, M., Ordentlich, P. & Evans, R.M. (2000) Isolation of a novel histone deacetylase reveals that class I and class II deacetylases promote SMRT-mediated repression. *Genes Dev*, **14**, 55-66.
- Kao, H.Y., Lee, C.H., Komarov, A., Han, C.C. & Evans, R.M. (2002) Isolation and characterization of mammalian HDAC10, a novel histone deacetylase. *J Biol Chem*, **277**, 187-193.
- Kawaguchi, Y., Kovacs, J.J., McLaurin, A., Vance, J.M., Ito, A. & Yao, T.P. (2003) The deacetylase HDAC6 regulates aggresome formation and cell viability in response to misfolded protein stress. *Cell*, **115**, 727-738.
- Kelly, A. & Stanley, C.A. (2001) Disorders of glutamate metabolism. *Ment Retard Dev Disabil Res Rev*, **7**, 287-295.
- Kelly, W.K., O'Connor, O.A. & Marks, P.A. (2002) Histone deacetylase inhibitors: from target to clinical trials. *Expert Opin Investig Drugs*, **11**, 1695-1713.
- Kim, H.S., Patel, K., Muldoon-Jacobs, K., Bisht, K.S., Aykin-Burns, N., Pennington, J.D., van der Meer, R., Nguyen, P., Savage, J., Owens, K.M., Vassilopoulos, A., Ozden, O., Park, S.H., Singh, K.K., Abdulkadir, S.A., Spitz, D.R., Deng, C.X. & Gius, D. SIRT3 is a mitochondria-localized tumor suppressor required for maintenance of mitochondrial integrity and metabolism during stress. *Cancer Cell*, **17**, 41-52.
- Kim, S.C., Sprung, R., Chen, Y., Xu, Y., Ball, H., Pei, J., Cheng, T., Kho, Y., Xiao, H., Xiao, L., Grishin, N.V., White, M., Yang, X.J. & Zhao, Y. (2006) Substrate and functional diversity of lysine acetylation revealed by a proteomics survey. *Mol Cell*, **23**, 607-618.
- Kirch, H.C., Schroder, J., Hoppe, H., Esche, H., Seeber, S. & Schutte, J. (1998) Recombinant gene products of two natural variants of the human cytidine deaminase gene confer different deamination rates of cytarabine in vitro. *Exp Hematol*, **26**, 421-425.

- Klaus, M., Haferlach, T., Schnittger, S., Kern, W., Hiddemann, W. & Schoch, C. (2004) Cytogenetic profile in de novo acute myeloid leukemia with FAB subtypes M0, M1, and M2: a study based on 652 cases analyzed with morphology, cytogenetics, and fluorescence in situ hybridization. *Cancer Genet Cytogenet*, **155**, 47-56.
- Kobayashi, T., Kakahara, T., Uchiyama, M., Fukuda, T., Kishi, K. & Shibata, A. (1994) Low expression of the deoxycytidine kinase (dCK) gene in a 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine-resistant human leukemic cell line KY-Ra. *Leuk Lymphoma*, **15**, 503-505.
- Kohler, M., Johansson, B., Ludvigsson, J., Aman, P., Heim, S. & Mitelman, F. (1994) Acute myeloid leukemia (AML-M1) with multiple trisomies and t(8;21)(q22;q22). *Cancer Genet Cytogenet*, **73**, 79-81.
- Koipally, J., Renold, A., Kim, J. & Georgopoulos, K. (1999) Repression by Ikaros and Aiolos is mediated through histone deacetylase complexes. *Embo J*, **18**, 3090-3100.
- Kouzarides, T. (2007) Chromatin modifications and their function. *Cell*, **128**, 693-705.
- Kuendgen, A. & Lubbert, M. (2008) Current status of epigenetic treatment in myelodysplastic syndromes. *Ann Hematol*, **87**, 601-611.
- Kuendgen, A., Schmid, M., Schlenk, R., Knipp, S., Hildebrandt, B., Steidl, C., Germing, U., Haas, R., Dohner, H. & Gattermann, N. (2006) The histone deacetylase (HDAC) inhibitor valproic acid as monotherapy or in combination with all-trans retinoic acid in patients with acute myeloid leukemia. *Cancer*, **106**, 112-119.
- Kufe, D.W., Major, P.P., Egan, E.M. & Beardsley, G.P. (1980) Correlation of cytotoxicity with incorporation of ara-C into DNA. *J Biol Chem*, **255**, 8997-8900.
- Kwon, S., Zhang, Y. & Matthias, P. (2007) The deacetylase HDAC6 is a novel critical component of stress granules involved in the stress response. *Genes Dev*, **21**, 3381-3394.
- Kwong, Y.L., Yeung, D.Y. & Chan, J.C. (2009) Intrathecal chemotherapy for hematologic malignancies: drugs and toxicities. *Ann Hematol*, **88**, 193-201.
- Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, **227**, 680-685.
- Lamba, J.K. (2009) Genetic factors influencing cytarabine therapy. *Pharmacogenomics*, **10**, 1657-1674.
- Lamba, J.K., Crews, K., Pounds, S., Schuetz, E.G., Gresham, J., Gandhi, V., Plunkett, W., Rubnitz, J. & Ribeiro, R. (2007) Pharmacogenetics of deoxycytidine kinase: identification and characterization of novel genetic variants. *J Pharmacol Exp Ther*, **323**, 935-945.
- Lane, A.A. & Chabner, B.A. (2009) Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. *J Clin Oncol*, **27**, 5459-5468.
- Langabeer, S.E., Grimwade, D., Walker, H., Rogers, J.R., Burnett, A.K., Goldstone, A.H. & Linch, D.C. (1998) A study to determine whether trisomy 8, deleted 9q and trisomy 22 are markers of cryptic rearrangements of PML/RARalpha, AML1/ETO and CBFβ/MYH11 respectively in acute myeloid leukaemia. MRC Adult Leukaemia Working Party. Medical Research Council. *Br J Haematol*, **101**, 338-340.
- Law, I.K., Liu, L., Xu, A., Lam, K.S., Vanhoutte, P.M., Che, C.M., Leung, P.T. & Wang, Y. (2009) Identification and characterization of proteins interacting with SIRT1 and SIRT3: implications in the anti-aging and metabolic effects of sirtuins. *Proteomics*, **9**, 2444-2456.
- Lawless, M.W., O'Byrne, K.J. & Gray, S.G. (2009) Histone deacetylase inhibitors target diabetes via chromatin remodeling or as chemical chaperones? *Curr Diabetes Rev*, **5**, 201-209.
- Le Beau, M.M., Albain, K.S., Larson, R.A., Vardiman, J.W., Davis, E.M., Blough, R.R., Golomb, H.M. & Rowley, J.D. (1986) Clinical and cytogenetic correlations in 63 patients with therapy-related myelodysplastic syndromes and acute nonlymphocytic leu-

- kemia: further evidence for characteristic abnormalities of chromosomes no. 5 and 7. *J Clin Oncol*, **4**, 325-345.
- Le Beau, M.M., Espinosa, R., 3rd, Neuman, W.L., Stock, W., Roulston, D., Larson, R.A., Keinanen, M. & Westbrook, C.A. (1993) Cytogenetic and molecular delineation of the smallest commonly deleted region of chromosome 5 in malignant myeloid diseases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **90**, 5484-5488.
- Lee, Y.S., Lim, K.H., Guo, X., Kawaguchi, Y., Gao, Y., Barrientos, T., Ordentlich, P., Wang, X.F., Counter, C.M. & Yao, T.P. (2008) The cytoplasmic deacetylase HDAC6 is required for efficient oncogenic tumorigenesis. *Cancer Res*, **68**, 7561-7569.
- Lescai, F., Blanche, H., Nebel, A., Beekman, M., Sahbatou, M., Flachsbar, F., Slagboom, E., Schreiber, S., Sorbi, S., Passarino, G. & Franceschi, C. (2009) Human longevity and 11p15.5: a study in 1321 centenarians. *Eur J Hum Genet*.
- Lewontin, R.C. (1964) The Interaction of Selection and Linkage. I. General Considerations; Heterotic Models. *Genetics*, **49**, 49-67.
- Li, W., Zhang, B., Tang, J., Cao, Q., Wu, Y., Wu, C., Guo, J., Ling, E.A. & Liang, F. (2007) Sirtuin 2, a mammalian homolog of yeast silent information regulator-2 longevity regulator, is an oligodendroglial protein that decelerates cell differentiation through deacetylating alpha-tubulin. *J Neurosci*, **27**, 2606-2616.
- Liang, G., Lin, J.C., Wei, V., Yoo, C., Cheng, J.C., Nguyen, C.T., Weisenberger, D.J., Egger, G., Takai, D., Gonzales, F.A. & Jones, P.A. (2004) Distinct localization of histone H3 acetylation and H3-K4 methylation to the transcription start sites in the human genome. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101**, 7357-7362.
- Lin, R.J., Nagy, L., Inoue, S., Shao, W., Miller, W.H., Jr. & Evans, R.M. (1998) Role of the histone deacetylase complex in acute promyelocytic leukaemia. *Nature*, **391**, 811-814.
- Lindsey, J.C., Lusher, M.E., Strathdee, G., Brown, R., Gilbertson, R.J., Bailey, S., Ellison, D.W. & Clifford, S.C. (2006) Epigenetic inactivation of MCJ (DNAJD1) in malignant paediatric brain tumours. *Int J Cancer*, **118**, 346-352.
- Livak, K.J. & Schmittgen, T.D. (2001) Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2(-Delta Delta C(T)) Method. *Methods*, **25**, 402-408.
- Lombard, D.B., Alt, F.W., Cheng, H.L., Bunkenborg, J., Streeper, R.S., Mostoslavsky, R., Kim, J., Yancopoulos, G., Valenzuela, D., Murphy, A., Yang, Y., Chen, Y., Hirsche, M.D., Bronson, R.T., Haigis, M., Guarente, L.P., Farese, R.V., Jr., Weissman, S., Verdin, E. & Schwer, B. (2007) Mammalian Sir2 homolog SIRT3 regulates global mitochondrial lysine acetylation. *Mol Cell Biol*, **27**, 8807-8814.
- Look, A.T. (1997) Oncogenic transcription factors in the human acute leukemias. *Science*, **278**, 1059-1064.
- Lopez, J.A., Nassif, E., Vannicola, P., Krikorian, J.G. & Agarwal, R.P. (1985) Central nervous system pharmacokinetics of high-dose cytosine arabinoside. *J Neurooncol*, **3**, 119-124.
- Lowenberg, B., Downing, J.R. & Burnett, A. (1999) Acute myeloid leukemia. *N Engl J Med*, **341**, 1051-1062.
- Lübbert, M. & Claus, R. (2007a) Epigenetische Inaktivierung von Genexpression. *Onkologe*, **13**, 46-55.
- Lübbert, M. & Claus, R. (2007b) Epigenetische Inaktivierung von Genexpression  
Neue therapeutische Zielstrukturen in der Hämatonkologie. *Onkologe*, 46-55.
- Luger, K., Mader, A.W., Richmond, R.K., Sargent, D.F. & Richmond, T.J. (1997) Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution. *Nature*, **389**, 251-260.
- Luo, J., Nikolaev, A.Y., Imai, S., Chen, D., Su, F., Shiloh, A., Guarente, L. & Gu, W. (2001) Negative control of p53 by Sir2alpha promotes cell survival under stress. *Cell*, **107**, 137-148.

- Mahlknecht, U., Dransfeld, C.L., Bulut, N., Kramer, M., Thiede, C., Ehninger, G. & Schaich, M. (2009) SNP analyses in cytarabine metabolizing enzymes in AML patients and their impact on treatment response and patient survival: identification of CDA SNP C-451T as an independent prognostic parameter for survival. *Leukemia*, **23**, 1929-1932.
- Mahlknecht, U., Emiliani, S., Najfeld, V., Young, S. & Verdin, E. (1999) Genomic organization and chromosomal localization of the human histone deacetylase 3 gene. *Genomics*, **56**, 197-202.
- Mahlknecht, U. & Hoelzer, D. (2000) Histone acetylation modifiers in the pathogenesis of malignant disease. *Mol Med*, **6**, 623-644.
- Mahlknecht, U. & Hoelzer, D. (2003) [Epigenetic regulators as novel therapeutic targets in hematology/oncology]. *Dtsch Med Wochenschr*, **128**, 2423-2426.
- Mahlknecht, U., Schnittger, S., Will, J., Cicek, N. & Hoelzer, D. (2002) Chromosomal organization and localization of the human histone deacetylase 9 gene (HDAC9). *Biochem Biophys Res Commun*, **293**, 182-191.
- Mandel, M. & Higa, A. (1970) Calcium-dependent bacteriophage DNA infection. *J Mol Biol*, **53**, 159-162.
- Marchion, D. & Munster, P. (2007) Development of histone deacetylase inhibitors for cancer treatment. *Expert Rev Anticancer Ther*, **7**, 583-598.
- Marks, P., Rifkind, R.A., Richon, V.M., Breslow, R., Miller, T. & Kelly, W.K. (2001a) Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat Rev Cancer*, **1**, 194-202.
- Marks, P.A. & Breslow, R. (2007) Dimethyl sulfoxide to vorinostat: development of this histone deacetylase inhibitor as an anticancer drug. *Nat Biotechnol*, **25**, 84-90.
- Marks, P.A. & Xu, W.S. (2009) Histone deacetylase inhibitors: Potential in cancer therapy. *J Cell Biochem*, **107**, 600-608.
- Marquard, L., Gjerdrum, L.M., Christensen, I.J., Jensen, P.B., Sehested, M. & Ralfkiaer, E. (2008) Prognostic significance of the therapeutic targets histone deacetylase 1, 2, 6 and acetylated histone H4 in cutaneous T-cell lymphoma. *Histopathology*, **53**, 267-277.
- Maruyama, R., Shoji, F., Okamoto, T., Miyamoto, T., Miyake, T., Nakamura, T., Ikeda, J., Asoh, H., Yamaguchi, M., Yoshino, I. & Ichinose, Y. (2004) Prognostic value of visceral pleural invasion in resected non-small cell lung cancer diagnosed by using a jet stream of saline solution. *J Thorac Cardiovasc Surg*, **127**, 1587-1592.
- Matsuyama, A., Shimazu, T., Sumida, Y., Saito, A., Yoshimatsu, Y., Seigneurin-Berny, D., Osada, H., Komatsu, Y., Nishino, N., Khochbin, S., Horinouchi, S. & Yoshida, M. (2002) In vivo destabilization of dynamic microtubules by HDAC6-mediated deacetylation. *Embo J*, **21**, 6820-6831.
- Mei, S., Ho, A.D. & Mahlknecht, U. (2004) Role of histone deacetylase inhibitors in the treatment of cancer (Review). *Int J Oncol*, **25**, 1509-1519.
- Melnick, A. & Licht, J.D. (2002) Histone deacetylases as therapeutic targets in hematologic malignancies. *Curr Opin Hematol*, **9**, 322-332.
- Mercurio, C., Minucci, S. & Pelicci, P.G. (2010) Histone deacetylases and epigenetic therapies of hematological malignancies. *Pharmacological Research*.
- Michan, S. & Sinclair, D. (2007) Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J*, **404**, 1-13.
- Michishita, E., Park, J.Y., Burneskis, J.M., Barrett, J.C. & Horikawa, I. (2005) Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. *Mol Biol Cell*, **16**, 4623-4635.
- Milano, G., Chamorey, A.L. & Thyss, A. (2002) [Clinical pharmacology of nucleoside analogues]. *Bull Cancer*, **89 Spec No**, S71-75.
- Minucci, S. & Pelicci, P.G. (2006) Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer*, **6**, 38-51.

- Mitelman, F. & Heim, S. (1992) Quantitative acute leukemia cytogenetics. *Genes Chromosomes Cancer*, **5**, 57-66.
- Mohr, B., Bornhauser, M., Thiede, C., Schakel, U., Schaich, M., Illmer, T., Pascheberg, U. & Ehninger, G. (2000) Comparison of spectral karyotyping and conventional cytogenetics in 39 patients with acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Leukemia*, **14**, 1031-1038.
- Moradei, O., Vaisburg, A. & Martell, R.E. (2008) Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy: new compounds and clinical update of benzamide-type agents. *Curr Top Med Chem*, **8**, 841-858.
- Motta, M.C., Divecha, N., Lemieux, M., Kamel, C., Chen, D., Gu, W., Bultsma, Y., McBurney, M. & Guarente, L. (2004) Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factors. *Cell*, **116**, 551-563.
- Muller, C.I., Ruter, B., Koeffler, H.P. & Lubbert, M. (2006) DNA hypermethylation of myeloid cells, a novel therapeutic target in MDS and AML. *Curr Pharm Biotechnol*, **7**, 315-321.
- Muller, W.E. & Zahn, R.K. (1979) Metabolism of 1-beta-D-arabinofuranosyluracil in mouse L5178Y cells. *Cancer Res*, **39**, 1102-1107.
- Mund, C., Brueckner, B. & Lyko, F. (2006) Reactivation of epigenetically silenced genes by DNA methyltransferase inhibitors: basic concepts and clinical applications. *Epigenetics*, **1**, 7-13.
- Muntean, A.G., Ge, Y., Taub, J.W. & Crispino, J.D. (2006) Transcription factor GATA-1 and Down syndrome leukemogenesis. *Leuk Lymphoma*, **47**, 986-997.
- Nakagawa, T. & Guarente, L. (2009) Urea cycle regulation by mitochondrial sirtuin, SIRT5. *Aging (Albany NY)*, **1**, 578-581.
- Nakagawa, T., Lomb, D.J., Haigis, M.C. & Guarente, L. (2009) SIRT5 Deacetylates carbamoyl phosphate synthetase 1 and regulates the urea cycle. *Cell*, **137**, 560-570.
- Nakata, S., Yoshida, T., Horinaka, M., Shiraishi, T., Wakada, M. & Sakai, T. (2004) Histone deacetylase inhibitors upregulate death receptor 5/TRAIL-R2 and sensitize apoptosis induced by TRAIL/APO2-L in human malignant tumor cells. *Oncogene*, **23**, 6261-6271.
- Nebbioso, A., Clarke, N., Voltz, E., Germain, E., Ambrosino, C., Bontempo, P., Alvarez, R., Schiavone, E.M., Ferrara, F., Bresciani, F., Weisz, A., de Lera, A.R., Gronemeyer, H. & Altucci, L. (2005) Tumor-selective action of HDAC inhibitors involves TRAIL induction in acute myeloid leukemia cells. *Nat Med*, **11**, 77-84.
- Neff, T. & Blau, C.A. (1996) Forced expression of cytidine deaminase confers resistance to cytosine arabinoside and gemcitabine. *Exp Hematol*, **24**, 1340-1346.
- Neumeister, P., Albanese, C., Balent, B., Grealley, J. & Pestell, R.G. (2002) Senescence and epigenetic dysregulation in cancer. *Int J Biochem Cell Biol*, **34**, 1475-1490.
- Nolan, L., Johnson, P.W., Ganesan, A., Packham, G. & Crabb, S.J. (2008) Will histone deacetylase inhibitors require combination with other agents to fulfil their therapeutic potential? *Br J Cancer*, **99**, 689-694.
- North, B.J., Marshall, B.L., Borra, M.T., Denu, J.M. & Verdin, E. (2003) The human Sir2 ortholog, SIRT2, is an NAD<sup>+</sup>-dependent tubulin deacetylase. *Mol Cell*, **11**, 437-444.
- North, B.J., Schwer, B., Ahuja, N., Marshall, B. & Verdin, E. (2005) Preparation of enzymatically active recombinant class III protein deacetylases. *Methods*, **36**, 338-345.
- Ogura, M., Nakamura, Y., Tanaka, D., Zhuang, X., Fujita, Y., Obara, A., Hamasaki, A., Hosokawa, M. & Inagaki, N. Overexpression of SIRT5 confirms its involvement in deacetylation and activation of carbamoyl phosphate synthetase 1. *Biochem Biophys Res Commun*.

- Onyango, P., Celic, I., McCaffery, J.M., Boeke, J.D. & Feinberg, A.P. (2002) SIRT3, a human SIR2 homologue, is an NAD-dependent deacetylase localized to mitochondria. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **99**, 13653-13658.
- Osada, H., Tatematsu, Y., Saito, H., Yatabe, Y., Mitsudomi, T. & Takahashi, T. (2004) Reduced expression of class II histone deacetylase genes is associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Int J Cancer*, **112**, 26-32.
- Osato, D.H., Huang, C.C., Kawamoto, M., Johns, S.J., Stryke, D., Wang, J., Ferrin, T.E., Herskowitz, I. & Giacomini, K.M. (2003) Functional characterization in yeast of genetic variants in the human equilibrative nucleoside transporter, ENT1. *Pharmacogenetics*, **13**, 297-301.
- Owens, J.K., Shewach, D.S., Ullman, B. & Mitchell, B.S. (1992) Resistance to 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine in human T-lymphoblasts mediated by mutations within the deoxycytidine kinase gene. *Cancer Res*, **52**, 2389-2393.
- Ozdog, H., Teschendorff, A.E., Ahmed, A.A., Hyland, S.J., Blenkiron, C., Bobrow, L., Veerakumarasivam, A., Burt, G., Subkhankulova, T., Arends, M.J., Collins, V.P., Bowtell, D., Kouzarides, T., Brenton, J.D. & Caldas, C. (2006) Differential expression of selected histone modifier genes in human solid cancers. *BMC Genomics*, **7**, 90.
- Pallas, M., Casadesus, G., Smith, M.A., Coto-Montes, A., Pelegri, C., Vilaplana, J. & Camins, A. (2009) Resveratrol and neurodegenerative diseases: activation of SIRT1 as the potential pathway towards neuroprotection. *Curr Neurovasc Res*, **6**, 70-81.
- Park, J.H., Kim, S.H., Choi, M.C., Lee, J., Oh, D.Y., Im, S.A., Bang, Y.J. & Kim, T.Y. (2008) Class II histone deacetylases play pivotal roles in heat shock protein 90-mediated proteasomal degradation of vascular endothelial growth factor receptors. *Biochem Biophys Res Commun*, **368**, 318-322.
- Parmigiani, R.B., Xu, W.S., Venta-Perez, G., Erdjument-Bromage, H., Yaneva, M., Tempst, P. & Marks, P.A. (2008) HDAC6 is a specific deacetylase of peroxiredoxins and is involved in redox regulation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **105**, 9633-9638.
- Pastor-Anglada, M., Molina-Arcas, M., Casado, F.J., Bellosillo, B., Colomer, D. & Gil, J. (2004) Nucleoside transporters in chronic lymphocytic leukaemia. *Leukemia*, **18**, 385-393.
- Perry, M.C. (2008) The chemotherapy source book.
- Petrie, K., Guidez, F., Howell, L., Healy, L., Waxman, S., Greaves, M. & Zelent, A. (2003) The histone deacetylase 9 gene encodes multiple protein isoforms. *J Biol Chem*, **278**, 16059-16072.
- Piecznik, S.R. & Neustadt, J. (2007) Mitochondrial dysfunction and molecular pathways of disease. *Exp Mol Pathol*, **83**, 84-92.
- Pierpaoli, E.V. (2005) The role of Hsp70 in age-related diseases and the prevention of cancer. *Ann N Y Acad Sci*, **1057**, 206-219.
- Plunkett, W., Iacoboni, S., Estey, E., Danhauser, L., Liliemark, J.O. & Keating, M.J. (1985) Pharmacologically directed ara-C therapy for refractory leukemia. *Semin Oncol*, **12**, 20-30.
- Preis, J.C., Dornhoff, W., Hagmann, F.-G. & Schmieder, A. (2008) Taschenbuch Onkologie.
- Pruitt, K., Zinn, R.L., Ohm, J.E., McGarvey, K.M., Kang, S.H., Watkins, D.N., Herman, J.G. & Baylin, S.B. (2006) Inhibition of SIRT1 reactivates silenced cancer genes without loss of promoter DNA hypermethylation. *PLoS Genet*, **2**, e40.
- Qian, D.Z., Kachhap, S.K., Collis, S.J., Verheul, H.M., Carducci, M.A., Atadja, P. & Pili, R. (2006a) Class II histone deacetylases are associated with VHL-independent regulation of hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Cancer Res*, **66**, 8814-8821.
- Qian, D.Z., Kato, Y., Shabbeer, S., Wei, Y., Verheul, H.M., Salumbides, B., Sanni, T., Atadja, P. & Pili, R. (2006b) Targeting tumor angiogenesis with histone deacetylase inhibitors: the hydroxamic acid derivative LBH589. *Clin Cancer Res*, **12**, 634-642.

- Rasheed, W., Bishton, M., Johnstone, R.W. & Prince, H.M. (2008) Histone deacetylase inhibitors in lymphoma and solid malignancies. *Expert Rev Anticancer Ther*, **8**, 413-432.
- Rasheed, W.K., Johnstone, R.W. & Prince, H.M. (2007) Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. *Expert Opin Investig Drugs*, **16**, 659-678.
- Richon, V.M., Emiliani, S., Verdin, E., Webb, Y., Breslow, R., Rifkind, R.A. & Marks, P.A. (1998) A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 3003-3007.
- Richon, V.M., Sandhoff, T.W., Rifkind, R.A. & Marks, P.A. (2000) Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **97**, 10014-10019.
- Richon, V.M., Webb, Y., Merger, R., Sheppard, T., Jursic, B., Ngo, L., Civoli, F., Breslow, R., Rifkind, R.A. & Marks, P.A. (1996) Second generation hybrid polar compounds are potent inducers of transformed cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **93**, 5705-5708.
- Ries, L., Harkins, D., Krapcho, M., Mariotto, A., Miller, B. & Feuer, E. (2006) SEER cancer statistics review 1975-2003. *Bethesda, MD, USA: National Cancer Institute*.
- Ritch, P.S., Hansen, R.M. & Heuer, D.K. (1983) Ocular toxicity from high-dose cytosine arabinoside. *Cancer*, **51**, 430-432.
- Rodgers, J.T., Lerin, C., Gerhart-Hines, Z. & Puigserver, P. (2008) Metabolic adaptations through the PGC-1 alpha and SIRT1 pathways. *FEBS Lett*, **582**, 46-53.
- Rosato, R.R., Almenara, J.A., Dai, Y. & Grant, S. (2003) Simultaneous activation of the intrinsic and extrinsic pathways by histone deacetylase (HDAC) inhibitors and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) synergistically induces mitochondrial damage and apoptosis in human leukemia cells. *Mol Cancer Ther*, **2**, 1273-1284.
- Rose, G., Dato, S., Altomare, K., Bellizzi, D., Garasto, S., Greco, V., Passarino, G., Feraco, E., Mari, V., Barbi, C., BonaFe, M., Franceschi, C., Tan, Q., Boiko, S., Yashin, A.I. & De Benedictis, G. (2003) Variability of the SIRT3 gene, human silent information regulator Sir2 homologue, and survivorship in the elderly. *Exp Gerontol*, **38**, 1065-1070.
- Roumier, C. & Cheok, M.H. (2009) Pharmacogenomics in acute myeloid leukemia. *Pharmacogenomics*, **10**, 1839-1851.
- Rowley, J.D., Golomb, H.M. & Vardiman, J.W. (1981) Nonrandom chromosome abnormalities in acute leukemia and dysmyelopoietic syndromes in patients with previously treated malignant disease. *Blood*, **58**, 759-767.
- Rubnitz, J.E., Gibson, B. & Smith, F.O. (2008) Acute myeloid leukemia. *Pediatr Clin North Am*, **55**, 21-51, ix.
- Ruefli, A.A., Ausserlechner, M.J., Bernhard, D., Sutton, V.R., Tainton, K.M., Kofler, R., Smyth, M.J. & Johnstone, R.W. (2001) The histone deacetylase inhibitor and chemotherapeutic agent suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) induces a cell-death pathway characterized by cleavage of Bid and production of reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **98**, 10833-10838.
- Russell, S.M., Burgess, R.J. & Mayer, R.J. (1982) Protein degradation in rat liver. Evidence for populations of protein degradation rates in cellular organelles. *Biochim Biophys Acta*, **714**, 34-45.
- Sachidanandam, R., Weissman, D., Schmidt, S.C., Kakol, J.M., Stein, L.D., Marth, G., Sherry, S., Mullikin, J.C., Mortimore, B.J., Willey, D.L., Hunt, S.E., Cole, C.G., Coghill, P.C., Rice, C.M., Ning, Z., Rogers, J., Bentley, D.R., Kwok, P.Y., Mardis, E.R., Yeh, R.T., Schultz, B., Cook, L., Davenport, R., Dante, M., Fulton, L., Hillier, L., Waterston, R.H., McPherson, J.D., Gilman, B., Schaffner, S., Van Etten, W.J., Reich, D.,

- Higgins, J., Daly, M.J., Blumenstiel, B., Baldwin, J., Stange-Thomann, N., Zody, M.C., Linton, L., Lander, E.S. & Altshuler, D. (2001) A map of human genome sequence variation containing 1.42 million single nucleotide polymorphisms. *Nature*, **409**, 928-933.
- Sade, H. & Sarin, A. (2004) Reactive oxygen species regulate quiescent T-cell apoptosis via the BH3-only proapoptotic protein BIM. *Cell Death Differ*, **11**, 416-423.
- Saiki, R.K., Gelfand, D.H., Stoffel, S., Scharf, S.J., Higuchi, R., Horn, G.T., Mullis, K.B. & Erlich, H.A. (1988) Primer-directed enzymatic amplification of DNA with a thermostable DNA polymerase. *Science*, **239**, 487-491.
- Saji, S., Kawakami, M., Hayashi, S., Yoshida, N., Hirose, M., Horiguchi, S., Itoh, A., Funata, N., Schreiber, S.L., Yoshida, M. & Toi, M. (2005) Significance of HDAC6 regulation via estrogen signaling for cell motility and prognosis in estrogen receptor-positive breast cancer. *Oncogene*, **24**, 4531-4539.
- Sambrook, J., Fritsch, E. & Maniatis, T. (2001) Molecular cloning - a laboratory manual. *Cold spring harbor laboratory press*, chapter 6.
- Sanders, B.D., Jackson, B., Brent, M., Taylor, A.M., Dang, W., Berger, S.L., Schreiber, S.L., Howitz, K. & Marmorstein, R. (2009) Identification and characterization of novel sirtuin inhibitor scaffolds. *Bioorg Med Chem*, **17**, 7031-7041.
- Sanger, F., Nicklen, S. & Coulson, A.R. (1977) DNA sequencing with chain-terminating inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **74**, 5463-5467.
- Schaich, M., Ritter, M., Illmer, T., Lisske, P., Thiede, C., Schakel, U., Mohr, B., Ehninger, G. & Neubauer, A. (2001) Mutations in ras proto-oncogenes are associated with lower *mdr1* gene expression in adult acute myeloid leukaemia. *Br J Haematol*, **112**, 300-307.
- Schatzschneider, U., Niesel, J., Ott, I., Gust, R., Alborzinia, H. & Wolf, S. (2008) Cellular uptake, cytotoxicity, and metabolic profiling of human cancer cells treated with ruthenium(II) polypyridyl complexes [Ru(bpy)<sub>2</sub>(N--N)]Cl<sub>2</sub> with N--N=bpy, phen, dpq, dppz, and dppn. *ChemMedChem*, **3**, 1104-1109.
- Scher, M.B., Vaquero, A. & Reinberg, D. (2007) SirT3 is a nuclear NAD<sup>+</sup>-dependent histone deacetylase that translocates to the mitochondria upon cellular stress. *Genes Dev*, **21**, 920-928.
- Scherer, W.F., Syverton, J.T. & Gey, G.O. (1953) Studies on the propagation in vitro of poliomyelitis viruses. IV. Viral multiplication in a stable strain of human malignant epithelial cells (strain HeLa) derived from an epidermoid carcinoma of the cervix. *J Exp Med*, **97**, 695-710.
- Schlicker, C., Gertz, M., Papatheodorou, P., Kachholz, B., Becker, C.F. & Steegborn, C. (2008) Substrates and regulation mechanisms for the human mitochondrial sirtuins Sirt3 and Sirt5. *J Mol Biol*, **382**, 790-801.
- Schmidt, M., Nagel, S., Proba, J., Thiede, C., Ritter, M., Waring, J.F., Rosenbauer, F., Huhn, D., Wittig, B., Horak, I. & Neubauer, A. (1998) Lack of interferon consensus sequence binding protein (ICSBP) transcripts in human myeloid leukemias. *Blood*, **91**, 22-29.
- Schmittgen, T.D., Zakrajsek, B.A., Mills, A.G., Gorn, V., Singer, M.J. & Reed, M.W. (2000) Quantitative reverse transcription-polymerase chain reaction to study mRNA decay: comparison of endpoint and real-time methods. *Anal Biochem*, **285**, 194-204.
- Schroder, J.K., Kirch, C., Flasshove, M., Kalweit, H., Seidelmann, M., Hilger, R., Seeber, S. & Schutte, J. (1996) Constitutive overexpression of the cytidine deaminase gene confers resistance to cytosine arabinoside in vitro. *Leukemia*, **10**, 1919-1924.
- Schroder, J.K., Seidelmann, M., Kirch, H.C., Seeber, S. & Schutte, J. (1998) Assessment of resistance induction to cytosine arabinoside following transfer and overexpression of the deoxycytidylate deaminase gene in vitro. *Leuk Res*, **22**, 619-624.

- Schrump, D.S. (2009) Cytotoxicity mediated by histone deacetylase inhibitors in cancer cells: mechanisms and potential clinical implications. *Clin Cancer Res*, **15**, 3947-3957.
- Schwer, B., Bunkenborg, J., Verdin, R.O., Andersen, J.S. & Verdin, E. (2006) Reversible lysine acetylation controls the activity of the mitochondrial enzyme acetyl-CoA synthetase 2. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **103**, 10224-10229.
- Schwer, B., North, B.J., Frye, R.A., Ott, M. & Verdin, E. (2002) The human silent information regulator (Sir)2 homologue hSIRT3 is a mitochondrial nicotinamide adenine dinucleotide-dependent deacetylase. *J Cell Biol*, **158**, 647-657.
- Sengupta, N. & Seto, E. (2004) Regulation of histone deacetylase activities. *J Cell Biochem*, **93**, 57-67.
- Shan, B., Yao, T.P., Nguyen, H.T., Zhuo, Y., Levy, D.R., Klingsberg, R.C., Tao, H., Palmer, M.L., Holder, K.N. & Lasky, J.A. (2008) Requirement of HDAC6 for transforming growth factor-beta1-induced epithelial-mesenchymal transition. *J Biol Chem*, **283**, 21065-21073.
- Sharma, S., Kelly, T.K. & Jones, P.A. Epigenetics in cancer. *Carcinogenesis*, **31**, 27-36.
- Sharrocks, A.D., Brown, A.L., Ling, Y. & Yates, P.R. (1997) The ETS-domain transcription factor family. *Int J Biochem Cell Biol*, **29**, 1371-1387.
- Sherry, S.T., Ward, M.H., Kholodov, M., Baker, J., Phan, L., Smigielski, E.M. & Sirotkin, K. (2001) dbSNP: the NCBI database of genetic variation. *Nucleic Acids Res*, **29**, 308-311.
- Shi, J.Y., Shi, Z.Z., Zhang, S.J., Zhu, Y.M., Gu, B.W., Li, G., Bai, X.T., Gao, X.D., Hu, J., Jin, W., Huang, W., Chen, Z. & Chen, S.J. (2004) Association between single nucleotide polymorphisms in deoxycytidine kinase and treatment response among acute myeloid leukaemia patients. *Pharmacogenetics*, **14**, 759-768.
- Shi, T., Wang, F., Stieren, E. & Tong, Q. (2005) SIRT3, a mitochondrial sirtuin deacetylase, regulates mitochondrial function and thermogenesis in brown adipocytes. *J Biol Chem*, **280**, 13560-13567.
- Silagi, S. (1965) Metabolism of 1-beta-D-arabinofuranosylcytosine in L cells. *Cancer Res*, **25**, 1446-1453.
- Singh, T.R., Shankar, S. & Srivastava, R.K. (2005) HDAC inhibitors enhance the apoptosis-inducing potential of TRAIL in breast carcinoma. *Oncogene*, **24**, 4609-4623.
- Slevin, M.L., Pfall, E.M., Aherne, G.W., Harvey, V.J., Johnston, A. & Lister, T.A. (1983) Effect of dose and schedule on pharmacokinetics of high-dose cytosine arabinoside in plasma and cerebrospinal fluid. *J Clin Oncol*, **1**, 546-551.
- Smigielski, E.M., Sirotkin, K., Ward, M. & Sherry, S.T. (2000) dbSNP: a database of single nucleotide polymorphisms. *Nucleic Acids Res*, **28**, 352-355.
- Smith, M., Barnett, M., Bassan, R., Gatta, G., Tondini, C. & Kern, W. (2004) Adult acute myeloid leukaemia. *Crit Rev Oncol Hematol*, **50**, 197-222.
- So, C.W., Karsunky, H., Passegue, E., Cozzio, A., Weissman, I.L. & Cleary, M.L. (2003) MLL-GAS7 transforms multipotent hematopoietic progenitors and induces mixed lineage leukemias in mice. *Cancer Cell*, **3**, 161-171.
- Soti, C. & Csermely, P. (2002) Chaperones and aging: role in neurodegeneration and in other civilizational diseases. *Neurochem Int*, **41**, 383-389.
- Stam, R.W., den Boer, M.L., Meijerink, J.P., Ebus, M.E., Peters, G.J., Noordhuis, P., Janka-Schaub, G.E., Armstrong, S.A., Korsmeyer, S.J. & Pieters, R. (2003) Differential mRNA expression of Ara-C-metabolizing enzymes explains Ara-C sensitivity in MLL gene-rearranged infant acute lymphoblastic leukemia. *Blood*, **101**, 1270-1276.
- Stimson, L. & La Thangue, N.B. (2009) Biomarkers for predicting clinical responses to HDAC inhibitors. *Cancer Lett*, **280**, 177-183.

- Stolzenberg-Solomon, R.Z., Graubard, B.I., Chari, S., Limburg, P., Taylor, P.R., Virtamo, J. & Albanes, D. (2005) Insulin, glucose, insulin resistance, and pancreatic cancer in male smokers. *Jama*, **294**, 2872-2878.
- Stunkel, W., Peh, B.K., Tan, Y.C., Nayagam, V.M., Wang, X., Salto-Tellez, M., Ni, B., Entzeroth, M. & Wood, J. (2007) Function of the SIRT1 protein deacetylase in cancer. *Biotechnol J*, **2**, 1360-1368.
- Sugiyama, E., Kaniwa, N., Kim, S.R., Kikura-Hanajiri, R., Hasegawa, R., Maekawa, K., Saito, Y., Ozawa, S., Sawada, J., Kamatani, N., Furuse, J., Ishii, H., Yoshida, T., Ueno, H., Okusaka, T. & Saijo, N. (2007) Pharmacokinetics of gemcitabine in Japanese cancer patients: the impact of a cytidine deaminase polymorphism. *J Clin Oncol*, **25**, 32-42.
- Sundaresan, N.R., Samant, S.A., Pillai, V.B., Rajamohan, S.B. & Gupta, M.P. (2008) SIRT3 is a stress-responsive deacetylase in cardiomyocytes that protects cells from stress-mediated cell death by deacetylation of Ku70. *Mol Cell Biol*, **28**, 6384-6401.
- Sutheesophon, K., Nishimura, N., Kobayashi, Y., Furukawa, Y., Kawano, M., Itoh, K., Kano, Y. & Ishii, H. (2005) Involvement of the tumor necrosis factor (TNF)/TNF receptor system in leukemic cell apoptosis induced by histone deacetylase inhibitor depsipeptide (FK228). *J Cell Physiol*, **203**, 387-397.
- Thedinga, E., Kob, A., Holst, H., Keuer, A., Drechsler, S., Niendorf, R., Baumann, W., Freund, I., Lehmann, M. & Ehret, R. (2007) Online monitoring of cell metabolism for studying pharmacodynamic effects. *Toxicol Appl Pharmacol*, **220**, 33-44.
- Tong, J.J., Liu, J., Bertos, N.R. & Yang, X.J. (2002) Identification of HDAC10, a novel class II human histone deacetylase containing a leucine-rich domain. *Nucleic Acids Res*, **30**, 1114-1123.
- Tsapis, M., Lieb, M., Manzo, F., Shankaranarayanan, P., Herbrecht, R., Lutz, P. & Gronemeyer, H. (2007) HDAC inhibitors induce apoptosis in glucocorticoid-resistant acute lymphatic leukemia cells despite a switch from the extrinsic to the intrinsic death pathway. *Int J Biochem Cell Biol*, **39**, 1500-1509.
- Ueno, H., Kaniwa, N., Okusaka, T., Ikeda, M., Morizane, C., Kondo, S., Sugiyama, E., Kim, S.R., Hasegawa, R., Saito, Y., Yoshida, T., Saijo, N. & Sawada, J. (2009) Homozygous CDA\*3 is a major cause of life-threatening toxicities in gemcitabine-treated Japanese cancer patients. *Br J Cancer*, **100**, 870-873.
- Ungerstedt, J.S., Sowa, Y., Xu, W.S., Shao, Y., Dokmanovic, M., Perez, G., Ngo, L., Holmgren, A., Jiang, X. & Marks, P.A. (2005) Role of thioredoxin in the response of normal and transformed cells to histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 673-678.
- Vakhrusheva, O., Smolka, C., Gajawada, P., Kostin, S., Boettger, T., Kubin, T., Braun, T. & Bober, E. (2008) Sirt7 increases stress resistance of cardiomyocytes and prevents apoptosis and inflammatory cardiomyopathy in mice. *Circ Res*, **102**, 703-710.
- van Leeuwen, I. & Lain, S. (2009) Sirtuins and p53. *Adv Cancer Res*, **102**, 171-195.
- Vaquero, A., Sternglanz, R. & Reinberg, D. (2007) NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylation of H4 lysine 16 by class III HDACs. *Oncogene*, **26**, 5505-5520.
- Vardiman, J.W., Thiele, J., Arber, D.A., Brunning, R.D., Borowitz, M.J., Porwit, A., Harris, N.L., Le Beau, M.M., Hellstrom-Lindberg, E., Tefferi, A. & Bloomfield, C.D. (2009) The 2008 revision of the World Health Organization (WHO) classification of myeloid neoplasms and acute leukemia: rationale and important changes. *Blood*, **114**, 937-951.
- Vaziri, H., Dessain, S.K., Ng Eaton, E., Imai, S.I., Frye, R.A., Pandita, T.K., Guarente, L. & Weinberg, R.A. (2001) hSIR2(SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell*, **107**, 149-159.
- Vegarud, G. & Christnsen, T.B. (1975) Glycosylation of Proteins: a new method of enzyme stabilization. *Biotechnol Bioeng*, **17**, 1391-1397.

- Verdel, A. & Khochbin, S. (1999) Identification of a new family of higher eukaryotic histone deacetylases. Coordinate expression of differentiation-dependent chromatin modifiers. *J Biol Chem*, **274**, 2440-2445.
- Verdin, E., Dequiedt, F. & Kasler, H.G. (2003) Class II histone deacetylases: versatile regulators. *Trends Genet*, **19**, 286-293.
- Villagra, A., Cheng, F., Wang, H.W., Suarez, I., Glozak, M., Maurin, M., Nguyen, D., Wright, K.L., Atadja, P.W., Bhalla, K., Pinilla-Ibarz, J., Seto, E. & Sotomayor, E.M. (2009) The histone deacetylase HDAC11 regulates the expression of interleukin 10 and immune tolerance. *Nat Immunol*, **10**, 92-100.
- Voelter-Mahlknecht, S., Ho, A.D. & Mahlknecht, U. (2005) Chromosomal organization and localization of the novel class IV human histone deacetylase 11 gene. *Int J Mol Med*, **16**, 589-598.
- Wallace, D.C. (2005) A mitochondrial paradigm of metabolic and degenerative diseases, aging, and cancer: a dawn for evolutionary medicine. *Annu Rev Genet*, **39**, 359-407.
- Wang, D.G., Fan, J.B., Siao, C.J., Berno, A., Young, P., Sapolsky, R., Ghandour, G., Perkins, N., Winchester, E., Spencer, J., Kruglyak, L., Stein, L., Hsie, L., Topaloglou, T., Hubbell, E., Robinson, E., Mittmann, M., Morris, M.S., Shen, N., Kilburn, D., Rioux, J., Nusbaum, C., Rozen, S., Hudson, T.J., Lipshutz, R., Chee, M. & Lander, E.S. (1998a) Large-scale identification, mapping, and genotyping of single-nucleotide polymorphisms in the human genome. *Science*, **280**, 1077-1082.
- Wang, J., Hoshino, T., Redner, R.L., Kajigaya, S. & Liu, J.M. (1998b) ETO, fusion partner in t(8;21) acute myeloid leukemia, represses transcription by interaction with the human N-CoR/mSin3/HDAC1 complex. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **95**, 10860-10865.
- Wang, Z. & Moul, J. (2001) SNPs, protein structure, and disease. *Hum Mutat*, **17**, 263-270.
- Watanoto, K., Towatari, M., Ozawa, Y., Miyata, Y., Okamoto, M., Abe, A., Naoe, T. & Saito, H. (2003) Altered interaction of HDAC5 with GATA-1 during MEL cell differentiation. *Oncogene*, **22**, 9176-9184.
- Watanabe, S. & Uchida, T. (1996) Expression of cytidine deaminase in human solid tumors and its regulation by 1 alpha,25-dihydroxyvitamin D3. *Biochim Biophys Acta*, **1312**, 99-104.
- Weichert, W. (2009) HDAC expression and clinical prognosis in human malignancies. *Cancer Lett*, **280**, 168-176.
- Weinstein, H.J., Griffin, T.W., Feeney, J., Cohen, H.J., Propper, R.D. & Sallan, S.E. (1982) Pharmacokinetics of continuous intravenous and subcutaneous infusions of cytosine arabinoside. *Blood*, **59**, 1351-1353.
- White, J.C., Rathmell, J.P. & Capizzi, R.L. (1987) Membrane transport influences the rate of accumulation of cytosine arabinoside in human leukemia cells. *J Clin Invest*, **79**, 380-387.
- Whitesell, L. & Lindquist, S.L. (2005) HSP90 and the chaperoning of cancer. *Nat Rev Cancer*, **5**, 761-772.
- Wickstrom, S.A., Masoumi, K.C., Khochbin, S., Fassler, R. & Massoumi, R. (2009) CYLD negatively regulates cell-cycle progression by inactivating HDAC6 and increasing the levels of acetylated tubulin. *Embo J*.
- Wiley, J.S., Jones, S.P., Sawyer, W.H. & Paterson, A.R. (1982) Cytosine arabinoside influx and nucleoside transport sites in acute leukemia. *J Clin Invest*, **69**, 479-489.
- Wiley, J.S., Taupin, J., Jamieson, G.P., Snook, M., Sawyer, W.H. & Finch, L.R. (1985) Cytosine arabinoside transport and metabolism in acute leukemias and T cell lymphoblastic lymphoma. *J Clin Invest*, **75**, 632-642.
- Winter, J.N., Variakojis, D., Gaynor, E.R., Larson, R.A. & Miller, K.B. (1985) Low-dose cytosine arabinoside (Ara-C) therapy in the myelodysplastic syndromes and acute leukemia. *Cancer*, **56**, 443-449.

- Witt, O., Deubzer, H.E., Milde, T. & Oehme, I. (2009) HDAC family: What are the cancer relevant targets? *Cancer Lett*, **277**, 8-21.
- Wolffe, A.P. & Matzke, M.A. (1999) Epigenetics: regulation through repression. *Science*, **286**, 481-486.
- Xu, W.S., Parmigiani, R.B. & Marks, P.A. (2007) Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene*, **26**, 5541-5552.
- Xu, Y. (2003) Regulation of p53 responses by post-translational modifications. *Cell Death Differ*, **10**, 400-403.
- Yamamoto, H., Schoonjans, K. & Auwerx, J. (2007) Sirtuin functions in health and disease. *Mol Endocrinol*, **21**, 1745-1755.
- Yamashita, Y., Shimada, M., Harimoto, N., Rikimaru, T., Shirabe, K., Tanaka, S. & Sugimachi, K. (2003) Histone deacetylase inhibitor trichostatin A induces cell-cycle arrest/apoptosis and hepatocyte differentiation in human hepatoma cells. *Int J Cancer*, **103**, 572-576.
- Yang, W.M., Yao, Y.L., Sun, J.M., Davie, J.R. & Seto, E. (1997) Isolation and characterization of cDNAs corresponding to an additional member of the human histone deacetylase gene family. *J Biol Chem*, **272**, 28001-28007.
- Yang, Y., Cimen, H., Han, M.J., Shi, T., Deng, J.H., Koc, H., Palacios, O.M., Montier, L., Bai, Y., Tong, Q. & Koc, E.C. (2009) NAD<sup>+</sup>-dependent deacetylase SIRT3 regulates mitochondrial protein synthesis by deacetylation of the ribosomal protein MRPL10. *J Biol Chem*.
- Yang, Y., Rao, R., Shen, J., Tang, Y., Fiskus, W., Nechtman, J., Atadja, P. & Bhalla, K. (2008) Role of acetylation and extracellular location of heat shock protein 90 $\alpha$  in tumor cell invasion. *Cancer Res*, **68**, 4833-4842.
- Yoshizaki, T., Schenk, S., Imamura, T., Babendure, J.L., Sonoda, N., Bae, E.J., Oh, D., Lu, M., Milne, J.C., Westphal, C., Bandyopadhyay, G. & Olefsky, J.M. (2009) SIRT1 Inhibits Inflammatory Pathways in Macrophages and Modulates Insulin Sensitivity. *Am J Physiol Endocrinol Metab*.
- Yu, J. & Auwerx, J. (2009) The role of sirtuins in the control of metabolic homeostasis. *Ann NY Acad Sci*, **1173 Suppl 1**, E10-19.
- Yue, L., Saikawa, Y., Ota, K., Tanaka, M., Nishimura, R., Uehara, T., Maeba, H., Ito, T., Sasaki, T. & Koizumi, S. (2003) A functional single-nucleotide polymorphism in the human cytidine deaminase gene contributing to ara-C sensitivity. *Pharmacogenetics*, **13**, 29-38.
- Yue, P., Li, Z. & Moulton, J. (2005) Loss of protein structure stability as a major causative factor in monogenic disease. *J Mol Biol*, **353**, 459-473.
- Yue, P. & Moulton, J. (2006) Identification and analysis of deleterious human SNPs. *J Mol Biol*, **356**, 1263-1274.
- Zhang, Y., Adachi, M., Kawamura, R. & Imai, K. (2006) Bmf is a possible mediator in histone deacetylase inhibitors FK228 and CBHA-induced apoptosis. *Cell Death Differ*, **13**, 129-140.
- Zhang, Y., Kwon, S., Yamaguchi, T., Cubizolles, F., Rousseaux, S., Kneissel, M., Cao, C., Li, N., Cheng, H.L., Chua, K., Lombard, D., Mizeracki, A., Matthias, G., Alt, F.W., Khochbin, S. & Matthias, P. (2008) Mice lacking histone deacetylase 6 have hyperacetylated tubulin but are viable and develop normally. *Mol Cell Biol*, **28**, 1688-1701.
- Zhang, Z., Yamashita, H., Toyama, T., Sugiura, H., Omoto, Y., Ando, Y., Mita, K., Hamaguchi, M., Hayashi, S. & Iwase, H. (2004) HDAC6 expression is correlated with better survival in breast cancer. *Clin Cancer Res*, **10**, 6962-6968.
- Zhao, Y., Tan, J., Zhuang, L., Jiang, X., Liu, E.T. & Yu, Q. (2005) Inhibitors of histone deacetylases target the Rb-E2F1 pathway for apoptosis induction through activation of proapoptotic protein Bim. *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102**, 16090-16095.

Zuo, Y., Qiang, L. & Farmer, S.R. (2006) Activation of CCAAT/enhancer-binding protein (C/EBP) alpha expression by C/EBP beta during adipogenesis requires a peroxisome proliferator-activated receptor-gamma-associated repression of HDAC1 at the C/ebp alpha gene promoter. *J Biol Chem*, **281**, 7960-7967.

## 7 Eigene Publikationen und Präsentationen aus dieser Arbeit

### 7.1 Publiziert:

- **Monitoring of single protein activities on cellular metabolism through multiparametric biosensing**

Dransfeld CL, Alborzinia H, Wöfl S, Mahlkecht U.; Clinical epigenetics. 2010 May  
(in press)

- **SIRT3 SNPs validation in 640 individuals, functional analyses and new insights into SIRT3 stability**

Dransfeld CL, Alborzinia H, Wöfl S, Mahlkecht U.;  
International Journal of Oncology. 2010 April

- **SNP analyses in cytarabine metabolizing enzymes in AML patients and their impact on treatment response and patient survival: identification of CDA SNP C-451T as an independent prognostic parameter for survival.**

Mahlkecht U, Dransfeld CL, Bulut N, Kramer M, Thiede C, Ehninger G, Schaich M.  
Leukemia. 2009 May 21.

- **Class I HDAC SNP analysis in healthy donors compared to AML patients.**

Dransfeld CL, Schaich M, Ho AD, Thiede C, Ehninger G, Mahlkecht U.  
Leukemia. 2007 Jul;21(7):1587-90.

### 7.2 Eingereicht:

- **Sirtuin1 SNP (A2190G) is a diagnostic and prognostic marker for vibration-induced white finger disease (VWF)**

Voelter-Mahlkecht S, Rossbach B, Dransfeld CL, Letzel S, Mahlkecht U

### Kurz vor Einreichung:

- **AML-subtype specific HDAC-gene expression analysis and its impact on clinical outcome**

Dransfeld CL, Schaich M, Ong MF, Ehninger G, Mahlkecht U.;

### **7.3 Poster Präsentationen:**

**- DGHO, Leipzig 2007:**

“Class I HDAC SNP analysis in healthy donors compared to AML patients”

**- DGHO, Mannheim 2009:**

“SNP analyses in cytarabine metabolizing enzymes in AML patients and their impact on treatment response and patient survival: identification of CDA SNP C-451T as an independent prognostic parameter for survival.”

## 8 Anhang

### 8.1 Abbildungen

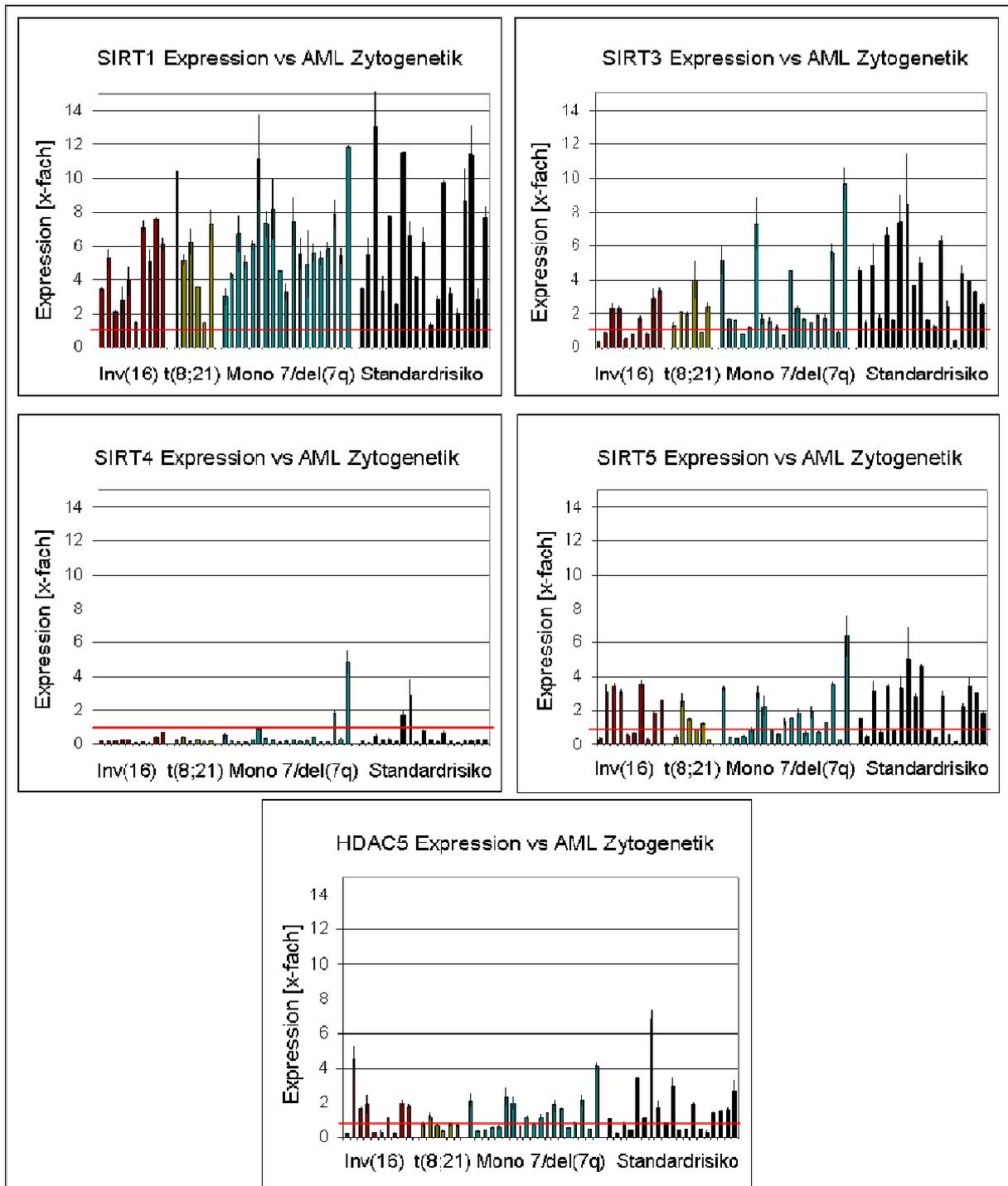
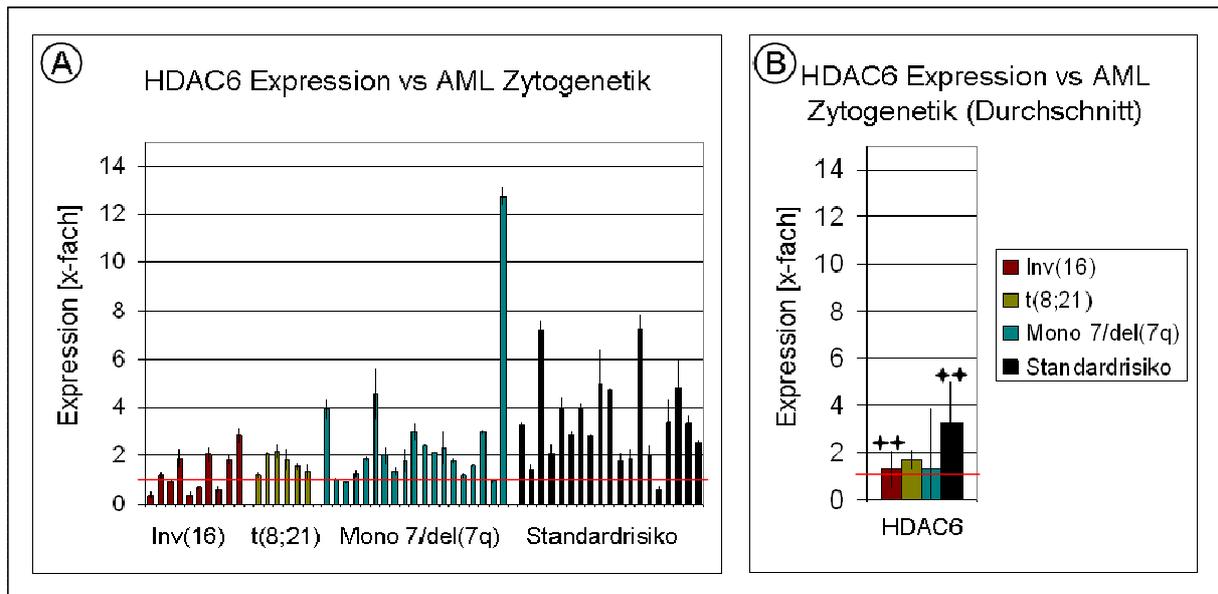
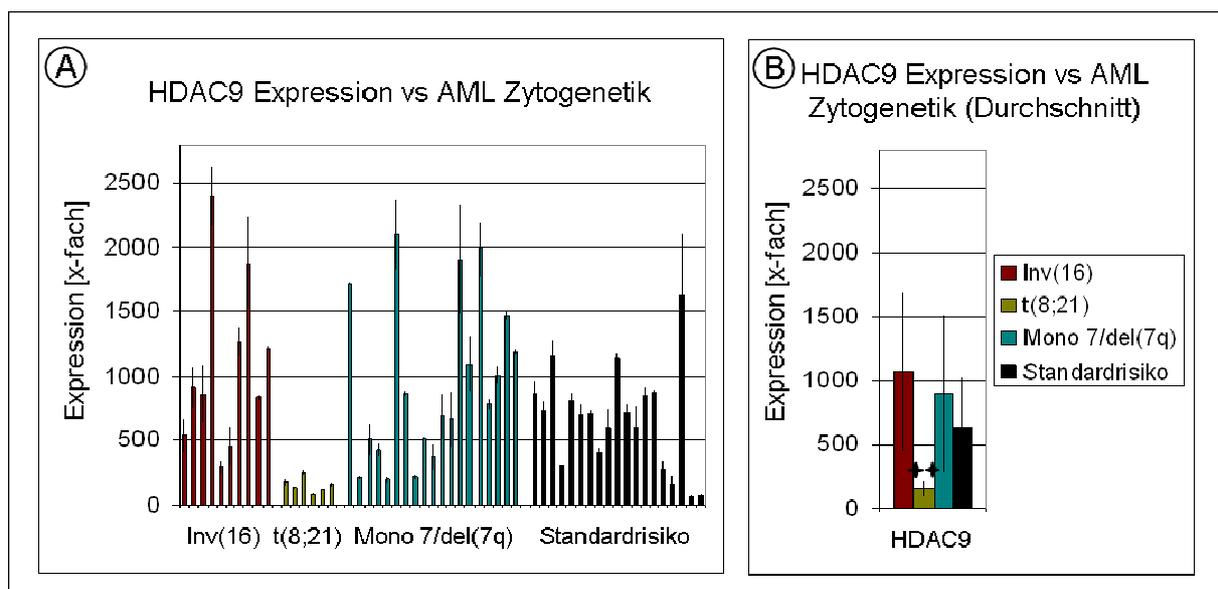


Abbildung 43: Korrelation der einzelnen HDAC Expressionen mit AML Gruppen mit bestimmten zytogenetischen Aberrationen.



**Abbildung 44: Korrelation der HDAC6 Expression mit AML Gruppen mit bestimmten zytogenetischen Aberrationen.**

(A) einzelne Werte und B) Durchschnitt mit Signifikanzen)



**Abbildung 45: Korrelation der HDAC9 Expression mit AML Gruppen mit bestimmten zytogenetischen Aberrationen.**

(A) einzelne Werte und B) Durchschnitt mit Signifikanzen)

## 8.2 Tabellen

**Tabelle 19: Signifikanzen (P-Werte) der AML-Subtypspezifischen HDAC Expressionsunterschiede.** Die statistische Auswertung erfolgte nach dem Man-Whitney U-Test (für nicht-parametrische Ergebnisse) und die p-Werte entsprechen der exakten, zweiseitigen Signifikanz.

	AML M1	AML M2	AML M4	AML M4/E0	AML M5a
<b>SIRT1</b>	<b>0,000</b>	0,141	0,087	0,473	0,173
<b>SIRT3</b>	<b>0,005</b>	0,084	0,436	0,263	0,945
<b>SIRT4</b>	0,054	0,86	0,386	0,463	0,221
<b>SIRT5</b>	<b>0,019</b>	<b>0,04</b>	0,923	0,815	0,133
<b>HDAC5</b>	0,08	0,145	1	0,791	0,73
<b>HDAC6</b>	<b>0,003</b>	0,312	0,416	<b>0,014</b>	0,774
<b>HDAC9</b>	0,418	<b>0,002</b>	0,169	0,128	0,197

**Tabelle 20: Signifikanzen (p-Werte) der Korrelation von HDAC Expressionsleveln und zytogenetischen Aberrationen.**

	Inv(16)	t(8;21)	Mono 7/del(7q)	Standard Risiko
<b>SIRT1</b>	0,131	0,892	0,256	0,993
<b>SIRT3</b>	0,99	0,713	0,331	<b>0,009</b>
<b>SIRT4</b>	0,302	0,877	0,62	0,823
<b>SIRT5</b>	0,825	0,626	0,406	0,318
<b>HDAC5</b>	0,776	0,205	0,502	0,651
<b>HDAC6</b>	<b>0,002</b>	0,54	0,633	<b>0,001</b>
<b>HDAC9</b>	0,058	<b>0,000</b>	0,136	0,642

## 9 Eidesstattliche Versicherung

Hiermit versichere ich an Eides statt, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet. Die Arbeit wurde bisher weder im In noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form in einem Verfahren zur Erlangung eines akademischen Grades vorgelegt.

Ort, Datum

(Unterschrift)

## 10 Danksagung

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die mich bei der Durchführung dieser Arbeit unterstützt haben:

Mein besonderer Dank geht an Herrn **Prof. Dr. Ulrich Mahlknecht, PhD** für die freundliche Aufnahme in seine Arbeitsgruppe, die der Arbeit zugrunde liegende interessante Fragestellung, die hervorragende Betreuung und konstruktiven Diskussionen, das Vertrauen und Ermöglichung externer Kooperationsprojekte, sowie Herrn **Prof. Dr. Gerald Thiel** für die Vertretung der Arbeit vor dem Naturwissenschaftlichen Fachbereich der Universität Saarbrücken.

Des Weiteren möchte ich mich bedanken bei meinen lieben ehemaligen und jetzigen **Kollegen und Kolleginnen** der Arbeitsgruppe Mahlknecht für die nette Zusammenarbeit und freundliche Arbeitsklima in allen Höhen und Tiefen des Laboralltags. Ein besonderer Dank geht dabei an Frau Dr. Barbara Zschörnig, Dr. Imke Bokelmann, Agnes Nokun, Frau Dr. Engel, Dr. Schönbein, Karin Pflieger, Christina Schleithoff, Anne Lahrmann, Carolin Novak, Navina Dahmke und Judith Katto, sowie Herrn Dominik Braunagel, Jan Prodöhl und Jan Purrucker, die mir mit guter Laune, Hilfsbereitschaft und Freundschaft zur Seite gestanden haben, sowie speziell bei Frau Nihal Bulut für die Mithilfe bei der Durchführung der SNP Analysen in Ara-C metabolisierenden Enzymen.

Ebenso danke ich allen Kollegen des José Carreras Zentrums, besonders Frau Sandra Reichrath, Dr. Kristina Heyne, Gabi Karbon, Herrn Dr. Dieter Preuß und Prof Dr. Römer für die stete Hilfs- und Diskussionsbereitschaft, sowie Frau Natalie Fadle für die Her- und Bereitstellung des c-Myc Antikörpers und Herrn Prof Eric Verdin (Gladstone Institute, San Francisco) für den Expressionsvektor für hSIRT3 wt.

Weiterhin danke ich unseren **Kooperationspartnern** der Universität Dresden, der Inneren Medizin III: Herrn Prof. Dr. C. Thiede, Prof. Dr. G. Ehninger, Prof. M. Schaich für die Bereitstellung der AML Proben und Herrn Dr. M. Kramer, sowie Frau Dr. Ong für die statistischen Analysen; sowie unseren Kooperationspartnern der Universität Heidelberg am Institut für Pharmazie und Molekulare Biotechnologie: Prof. Dr. Stephan Wölfl und Herrn Hamed Alborzinia für die Bereitstellung und gemeinsame Arbeit am Bionas-System und den Biosensor-Chips, sowie der gesamten Arbeitsgruppe für die Hilfsbereitschaft und das freundliche Arbeitsklima.

Ebenso danke ich meinen **Eltern** und meiner **Freundin, Marijana Grgic**, die mich immer und in jeder Hinsicht unterstützt haben.