

**Aus der Medizinischen Universitätsklinik und Poliklinik Tübingen
Abteilung Innere Medizin I
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. M. Gregor**

**Epigenetische Modulation durch Histondeacetylase Inhibition
als innovatives Therapieprinzip beim Hepatozellulären
Karzinom**

**Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin
der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen**

**vorgelegt von
Anita Pathil-Warth, geb. Pathil
aus
Stuttgart
2006**

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Privatdozent Dr. M. Bitzer

2. Berichterstatter: Professor Dr. C. Belka

„Was wir wissen ist ein Tropfen,
Was wir nicht wissen, ein Ozean.“

Isaac Newton

Für Arne und meine Eltern

Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung.....	1
1.1	Chromatinstruktur und transkriptionelle Regulation.....	1
1.2	Chomatinumbau („Chromatin remodelling“) durch Acetylierung und Deacetylierung von Histonproteinen.....	4
1.3	Die Rolle einer gestörter HDAC-Aktivität bei der malignen Transformation.....	6
1.4	HDAC-Inhibitoren (HDAC-I) – „Biomodulatoren“ mit Antitumoraktivität.....	9
1.5	HDAC-I und <i>TNF-related death inducing ligand</i> (TRAIL).....	13
1.6	Zielsetzung.....	15
2	Material und Methoden.....	17
2.1	Materialien.....	17
2.1.1	Laborchemikalien und Enzyme.....	17
2.1.2	Reagenzien.....	17
2.1.3	Verwendete Zelllinien.....	18
2.1.4	Plasmide.....	19
2.1.5	Oligonukleotide.....	19
2.1.6	Antikörper.....	20
2.2	Zellbiologische Methoden.....	21
2.2.1	Zellkultur.....	21
2.2.1.1	Allgemeines.....	21
2.2.1.2	Auftauen von Zellen.....	22
2.2.1.3	Zellpassage.....	23
2.2.1.4	Kryokonservierung von Zellen.....	23
2.2.1.5	Zellzählung mit dem Hämocytometer nach Neubauer.....	24
2.2.2	Transfektion.....	24

2.2.3	Durchflusszytometrie (FACS-Analyse).....	25
2.2.3.1	Apoptoseuntersuchung am Durchflusszytometer.....	26
2.2.3.2	Antikörpermarkierung für FACS-Analyse.....	28
2.3	Proteinchemische Methoden.....	28
2.3.1	Zellaufschluss.....	28
2.3.2	Sulforhodamin B-Assay.....	29
2.3.3	Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen (SDS-PAGE).....	31
2.3.4	Western Blotting.....	34
2.3.4.1	Proteintransfer.....	35
2.3.4.2	ECL-Detektionssystem.....	36
2.3.4.3	Strippen eines Westernblots.....	38
2.3.5	Fluorimetrische Bestimmung der Caspaseaktivität.....	39
2.3.6	Proteinbestimmung nach Bradford.....	40
2.3.7	Laktat-Dehydrogenase-Assay.....	41
2.3.8	ALT- und AST-Assay.....	42
2.4	Molekularbiologische Methoden.....	42
2.4.1	Isolierung von Gesamt-DNA aus adhärenen Zellen.....	43
2.4.2	c-DNA-Synthese.....	44
2.4.3	Quantitative RT-PCR.....	45
3	Ergebnisse.....	47
3.1	Histonhyperacetylierung in Hepatomzellen durch VPA und ITF2357.....	47
3.2	Antiproliferative Wirkung von VPA und ITF2357 auf Hepatomzellen.....	48
3.3	Apoptoseinduktion in Hepatomzellen durch HDAC-Inhibition.....	50
3.4	Toxizität der HDAC-I Wirkstoffe VPA und ITF2357 für primäre humane Hepatozyten.....	53
3.5	Expressionsmodulation von Proteinen der Zellzyklus-Regulation und Apoptose-Signaltransduktion.....	55

3.6	Hemmung der VPA- und ITF2357-vermittelten Apoptose durch Bcl-X _L -Überexpression.....	57
3.7	Sensibilisierung humaner Hepatomzellen gegenüber TRAIL durch VPA und ITF2357.....	59
3.8	Die Rolle des Histonacetylierungsstatus bei der TRAIL-Sensibilisierung von Hepatomzellen.....	63
3.9	TRAIL-Rezeptorstatus in HepG2-Zellen nach HDAC-Inhibition.....	65
3.10	Modulation der FLIP-Expression in Hepatomzellen und PHH durch VPA und ITF2357.....	67
3.11	Toxizitätsanalyse der HDAC-I/TRAIL- Kombinationstherapie auf PHH.....	70
4	Diskussion.....	72
4.1	Hemmung der Histondeacetylase-Aktivität als wirksames therapeutisches Prinzip in humanen Hepatomzelllinien.....	73
4.2	Expressionsmodulation von Proteinen der Zellzyklus-Regulation und der Apoptose-Signaltransduktion.....	74
4.3	Überwindung von Resistenzphänomenen durch Hemmung der Histondeacetylase-Aktivität in humanen Hepatomzellen.....	79
4.4	Molekulare Mechanismen einer HDAC-I vermittelten TRAIL-Sensibilisierung von Hepatomzellen.....	81
4.5	Klinische Anwendungsperspektive durch fehlende Toxizität von HDAC-I und TRAIL für primäre humane Hepatozyten.....	87
4.6	Schlussfolgerung.....	91
5	Zusammenfassung.....	93
6	Literaturverzeichnis.....	97

1 Einleitung

1.1 Chromatinstruktur und transkriptionelle Regulation

Die DNA eukaryontischer Zellen liegt im Zellkern nicht frei, sondern in einer verdichteten Form, dem Chromatin, vor. Dieser makromolekulare Komplex setzt sich aus den Einzelkomponenten DNA, Histonen und Nicht-Histonproteinen zusammen. Die funktionelle Basiseinheit des Chromatins ist das Nucleosom (Kornberg et al., 1977). Dieser hochkonservierte Nucleoproteinkomplex besteht aus einem sogenannten Nucleosomenkern (Core), geformt aus 146 Basenpaaren DNA, die in 1,65 Windungen einer linksgängigen Helix um ein Histonoktamer gewunden ist, welches sich aus den basischen Core-Histonproteinen H2A, H2B, H3 und H4 zusammensetzt (Abb. 1).

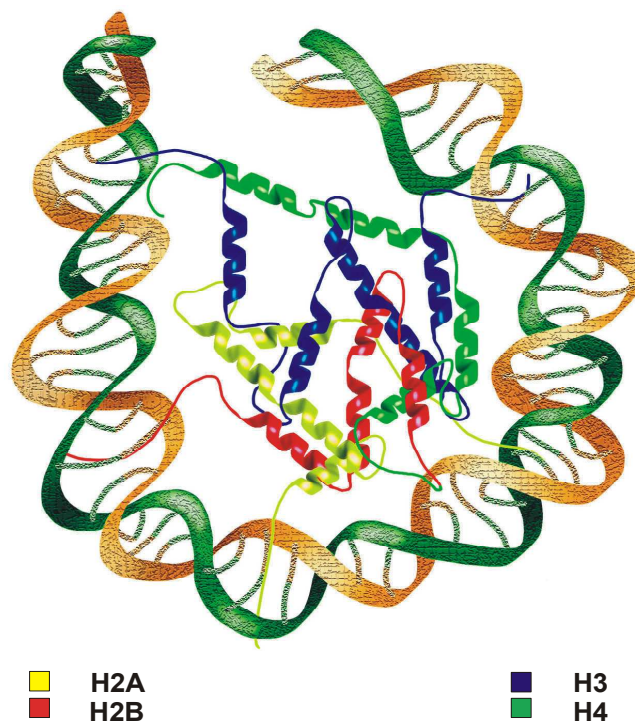


Abb. 1: Schematischer Aufbau eines Nucleosoms. Ansicht auf einen Nucleosomen-Core-Komplex entlang der superhelicalen Achse entsprechend einer röntgenkristallographische Analyse.

Die Heterodimerisierung von H3 und H4 mit anschließender Dimerisierung zum (H3-H4)₂-Tetramer sowie die Bildung des H2A-H2B-Dimers tragen entscheidend zur Stabilität des Nukleosomenkerns bei. Die einzelnen Nukleosomen werden durch sogenannte Linker-DNA unterschiedlicher Länge miteinander verknüpft, an welches das Linker-Histon H1 bindet und zur Stabilisierung des Chromatins zu Strukturen höherer Ordnung beiträgt. Die lineare DNA kann auf diese Weise etwa um den Faktor 30 - 40 verdichtet werden (Luger et al., 1998). Linker-Histone stellen im Gegensatz zu Histonproteinen des Nukleosomenkerns keine essentiellen Komponenten des Chromatins dar (Dasso et al., 1994), so dass ihre Bindung unter physiologischen Bedingungen auch schwächerer Natur ist als die der Core-Histone.

Die Konformationen der C-terminalen Domänen aller Core-Histone weisen eine hohe strukturelle Ähnlichkeit auf. Das sogenannte Histonfaltungsmotiv (Arents et al., 1991) beschreibt eine zentral gelegene, etwas längere α -Helix, die seitlich von kürzeren Helices und Schleifen, welche mit der DNA in Kontakt treten, flankiert wird. Die positiv geladenen N-terminalen Domänen der Core-Histone liegen außerhalb dieser Histonfaltungsregionen und ragen als „histone tails“ (Bohm et al., 1984) aus dem Core-Komplex heraus. Diese Regionen sind für die Bildung höher geordneter Chromatinstrukturen von elementarer Bedeutung, wie das Beispiel des N-Terminus von H4 verdeutlicht, welches bis zum benachbarten Nukleosom reicht und damit eine Interaktion mit dessen H2A-H2B-Dimer möglich macht (Luger et al., 1998).

Die N-terminalen Regionen der Histonproteine sind weiterhin Angriffspunkte für verschiedenste post-translationale Modifikationen, deren Ausmaß bzw. lokale Veränderung die Konformation des Chromatins und damit die Zugänglichkeit der DNA sowie die transkriptionelle Aktivität von Genen entscheidend beeinflusst.

Sehr vereinfachend kann gesagt werden, dass kondensiertes Chromatin eine Repression der Transkription vermittelt, während transkriptionell aktive Gene mit einer als „offenen“ bezeichneten Chromatinkonformation assoziiert sind (Jenuwein et al., 2001). Die Ursache liegt in der sterischen Anordnung von kondensiertem

Chromatin, welche den Zugang von Transkriptions- und Initiationsfaktoren an spezifische DNA-Sequenzen erschwert und damit einen generell repressiven Effekt auf die Transkription von Genen ausübt. Kovalente Modifikationen an den „histone tails“, die eine Änderung der Chromatinkondensation zur Folge haben, stellen also einen dynamischen Regulationsmechanismus zur Steuerung der transkriptionellen Aktivität dar (Abb. 2). Insbesondere die N-terminalen Regionen von H3 und H4 sind Zielstrukturen derartiger Modifikationen (Strahl et al., 2000) und umfassen Acetylierungs-, Methylierungs- und Phosphorylierungsprozesse, die insgesamt als „Histoncode“ bezeichnet worden sind (Wu et al., 2000; Jenuwein et al., 2001). Obwohl aufgrund des hohen Aufkommens an Histonproteinen in eukaryontischen Zellen die posttranslationalen Veränderungen der N-terminalen Histonenden schon früh beschrieben worden sind (Allfrey et al., 1964; Pogo et al., 1966), konnte die Kausalität zwischen diesen Modifikationen und den entsprechenden molekularen Vorgänge innerhalb der Zelle erst in den letzten Jahren u.a. mit Charakterisierung der beteiligten Enzyme und Entwicklung spezifischer Inhibitoren hergestellt werden.

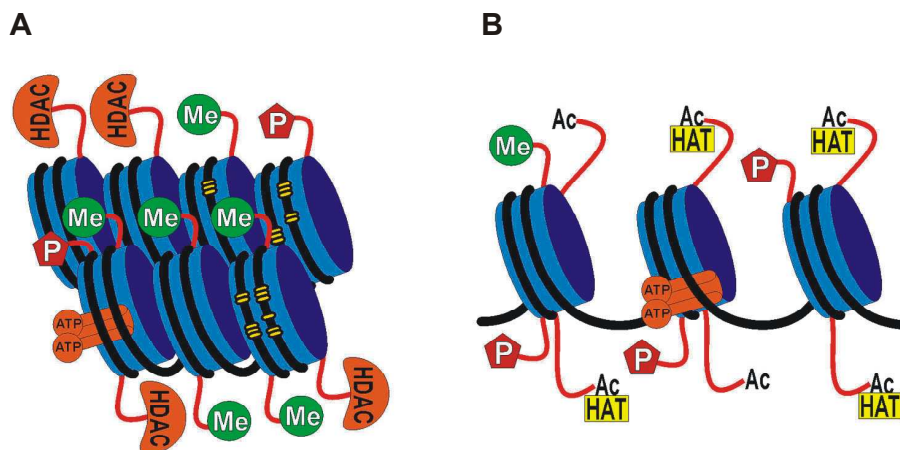


Abb. 2: Posttranslationale Modifikationen an Histonproteinen durch Methylierungs- (Me), Phosphorylierungs- (P) oder Acetylierungsvorgänge (Ac) führen zu einer Veränderung der Nucleosomenstruktur. A: DNA-Methylierung und Histondeacetylierung induzieren eine kompakte Chromatinstruktur und transkriptionelle Repression. B: Histonacetylierung und DNA-Demethylierung relaxieren das Chromatin und erlauben transkriptionelle Aktivierung. HDAC = Histon-Deacetylase; HAT = Histon-Acetyltransferase.

1.2 Chromatinumbau („Chromatin remodelling“) durch Acetylierung und Deacetylierung von Histonproteinen

Die bei weitem häufigsten und am besten charakterisierten posttranslationalen Veränderungen an Histonproteinen sind eine reversible Acetylierung bzw. Deacetylierung an spezifischen N-terminalen Lysinresten von Histonen. Das dynamische Gleichgewicht zwischen diesen beiden Reaktionen wird von zwei kompetitiven Enzymfamilien, den Histon-Acetyltransferasen (HAT) und den Histon-Deacetylasen (HDAC), reguliert.

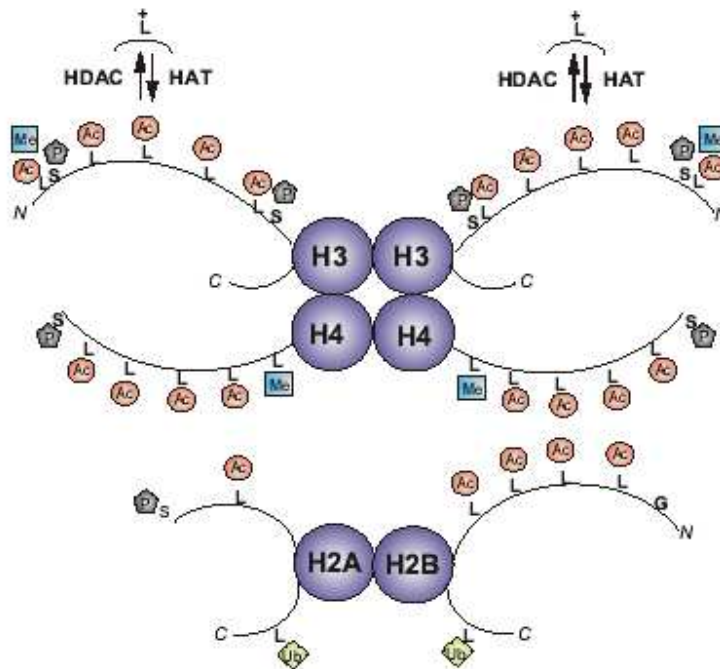


Abb. 3: N-terminale Lysinreste von Histonen sind potentielle Substrate des gegensätzlich arbeitenden Enzympaares HAT und HDAC. L = Lysin ; Ub = Ubiquitin; P = Phosphat; Ac = Acetyl; Me = Methyl ; S = Serin; G = Glutaminsäure.

Die Acetylierung von Histonproteinen durch Übertragung einer aktivierten Acetylgruppe auf N-terminale Lysinreste wird durch HAT katalysiert. Diese posttranslationalen Modifikation korreliert mit einer erhöhten transkriptionellen Aktivität (Marmorstein et al., 2001), welcher ein Umbau („remodelling“) der Chromatin-

struktur zugrunde liegt. Unter physiologischen Bedingungen weisen hypoacetylierte Histonenenden positiv geladene Lysinreste auf (Abb. 3), welche aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen eine enge Bindung mit dem negativ geladenen Phosphatgerüst der DNA eingehen. Dies resultiert in einer kondensierten Chromatinstruktur und daraus folgt eine Repression der Transkription. Die Acetylierung durch HAT neutralisiert diese positiv geladenen Lysinreste in einer Amidbindung, so dass durch eine Veränderung des „supercoilings“ der nukleosomalen DNA (Norton et al., 1989) und einer erhöhten Mobilität der Histone innerhalb des Nukleosomenkomplexes (Cary et al., 1982) eine „offenere“ Konformation der DNA vorliegt, welche die Transkription korrespondierender Gene begünstigt.

Der umgekehrte Vorgang, die Deacetylierung von N-terminalen Lysinresten, wird analog durch die antagonistischen Enzyme mit HDAC-Aktivität bewerkstelligt und führt über die Demaskierung der positiv geladenen Lysinreste zur Kondensation des Chromatins (Davie et al., 1998) und zur transkriptionellen Repression von Zielgenen.

Der Großteil der bisher charakterisierten humanen Proteine mit HAT- oder HDAC-Aktivität ist Teil hochmolekularer Multiproteinkomplexe mit transkriptioneller Koaktivator- oder Korepressoraktivität (Ng et al., 2000; Ahringer et al., 2000). Die Rekrutierung von HAT und HDAC zu bestimmten Chromatinregionen erfolgt über eine Interaktion mit sequenzspezifischen DNA-Bindungsproteinen (Legube et al., 2003). Steroid- und Thyroidhormonrezeptoren sind Beispiele für Transkriptionsfaktoren, welche über Korepressoren wie NCoR („nuclear-receptor corepressor“), SMRT („silencing mediator for retinoid and thyroid-hormone receptors“) oder SIN3 („switch independent 3“) Histon-Deacetylasen rekrutieren (Ordentlich et al., 2001). Innerhalb des Multiproteinkomplexes modifizieren HDAC Enzyme durch Histon-deacetylierung die lokale Chromatinstruktur, während die Korepressoren einen zusätzlichen negativen Effekt auf den Aktivitätsgrad des basalen Transkriptionsapparates ausüben können. Analog zu HDAC Enzymen wurden auch für HAT Enzyme Kofaktoren und Transkriptionsfaktoren identifiziert, die HATs binden und

eine spezifische Interaktion mit den entsprechenden Erkennungssequenzen vermitteln (Workman et al., 1998).

1.3 Die Rolle einer gestörten HDAC-Aktivität bei der malignen Transformation

Zellproliferation und -differenzierung werden von einer hierarchisch geordneten, sequentiellen Abfolge von Genaktivierungen reguliert, welche wiederum auf der Ebene der Chromatinstruktur mit kontrolliert werden (Muller et al., 2001). Die Kontrolle der Zellzahl, einschließlich der Eliminierung von Zellen aus dem Zellzyklus, z. B. durch Apoptosephänomene, ist in diese Kontrollprogramme eingebettet.

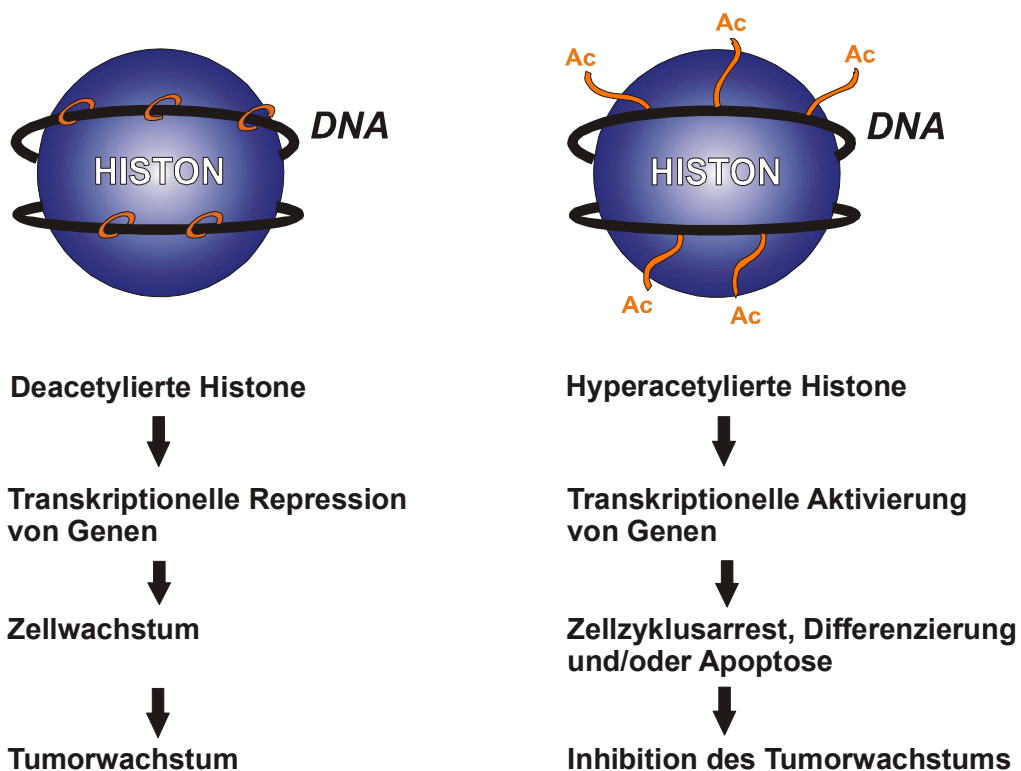


Abb. 4: Die Rolle der Chromatinstruktur bei der malignen Transformation. Ac = Acetylierung.

Eine Störung der Zusammensetzung von Proteinkomplexen, die verantwortlich für die Chromatinstruktur sind, kann somit die höher geordneten Prozesse auf dieser Ebene empfindlich stören, so dass sie durch unkontrollierte Proliferation, Dedifferenzierung und Hemmung von Apoptosephänomenen Teil einer malignen Transformation sein können (Johnstone et al., 2002; Abb. 4). So können Genmutationen, welche in funktionell inaktiven HAT, überexprimierten HDAC oder einer fehlerhaften Rekrutierung von HAT und HDAC Enzymen zu bestimmten Zielstrukturen resultieren, durch epigenetische Veränderungen, an der Tumorentstehung maßgeblich beteiligt sein (Jacobson et al., 1999; Kouzandes et al., 1999; Esteller et al., 2002).

Die Zusammenhänge zwischen aberranter HDAC-Aktivität und maligner Entartung sind bisher in der Onkogenese der akuten Promyelozytenleukämie (APL) am besten aufgeklärt (He et al., 1998; Lin et al., 1998; Grignani et al., 1998). Aufgrund von chromosomalen Translokationen wird in APL-Patienten die Bildung von onkogenen Retinolsäure-Rezeptor(RAR)-Fusionsproteinen induziert, welche die Differenzierung der myeloischen Zellreihe durch fehlerhafte Aktivierung von HDAC-Komplexen blockieren.

Der Retinolsäure-Rezeptor reguliert physiologischerweise durch Interaktion mit seinem natürlichen Liganden Retinolsäure (RA) die Transkription bestimmter RAR-Zielgene. In Abwesenheit des Liganden kommt es nach Bindung an spezifische DNA-Elemente über NCoR oder SMRT zur Rekrutierung von SIN3/HDAC-Komplexen und konsekutiv zur transkriptionellen Repression, während der Zusatz von RA antagonistisch eine Freisetzung der HDAC-Komplexe bewirkt und durch Rekrutierung von HATs die Transkription der RAR-Zielgene wieder reaktiviert (Lin et al., 2001; Zelent et al., 2001; Pandolfi et al., 2001). Die beiden Fusionsproteine *promyelocytic leucaemia*(PML)-RAR [t(15;17)] und *promyelocytic leucaemia zinc finger*(PLZF)-RAR [t(11;17)] stören diese Koordination, indem sie mit hoher Affinität HDACs binden und gleichzeitig aber unempfindlich sind für die Gegenregulation von RA, was zu einer konstitutiven Repression von Genen führt, welche für den Differenzierungsprozess der Myelozyten notwendig sind (Lin et al., 2001;

Zelent et al., 2001; Pandolfi et al., 2001). Der Zusatz von Histondeacetylase-Inhibitoren (HDAC-I) ist in der Lage, die Differenzierungsblockade in diesen APL-Zellen zu überwinden, was die Hypothese bestätigt, dass die HDAC-vermittelte Dysregulation der Genexpression eine zentrale Rolle in der Pathogenese der APL spielt.

Die HDAC-abhängige transkriptionelle Repression in der Entwicklung von APL dient als Modell für ein onkogenes Ereignis, welches nicht nur bei hämatologischen Krebserkrankungen, wie dem Non-Hodgkin-Lymphom (Huynh et al., 2000) oder der akuten myeloischen Leukämie (Heibert et al., 2001; Licht et al., 2001) stattfindet, sondern auch für solide Tumoren nachweisbar ist. Für die Entstehung und Progression dieser Malignome scheint insbesondere eine gestörte Balance zwischen HDAC- und HAT-Aktivität von Bedeutung zu sein.

So sind z. B. Mutationen von spezifischen HAT wie p300 und CBP (*CREB (cAMP responsive element-binding protein)-binding-protein*) bei Patienten mit kongenitalem Rubenstein-Taybi-Syndrom nachweisbar; einer Erkrankung, die mit einer starken Neigung zur Malignomentwicklung assoziiert ist (Iyer et al., 2004). Ein weiteres Beispiel für die Bedeutung der dysregulierten HDAC- bzw. HAT-Aktivität für die Tumorentstehung ist eine Untersuchung an *Knock-out*-Mäusen, denen das Tumorsuppressor-Gen APC (Adenomatosis Polyposis Coli) fehlt. Die Studie konnte in den Kolonkarzinomen dieser Tiere eine Überexpression des Enzyms HDAC2 feststellen. Der Verlust von funktionellem APC, der ein Schlüsselereignis in der Pathogenese von kolorektalen Tumoren darstellt, scheint offensichtlich auch mit einer übermäßigen HDAC-Aktivität in Verbindung zu stehen. Interessanterweise führte die experimentelle Inhibition von HDAC2 in Kolonkarzinom-Zelllinien zum Zelluntergang, so dass die Überexpression dieses Enzyms wahrscheinlich wichtige Funktionen für den Schutz der Tumorzelle gegenüber der Apoptose erfüllt (Zhu et al., 2004). Zusammenfassend zeigen diese Untersuchungen, dass die dysregulierte HDAC-Aktivität bzw. ein Ungleichgewicht zwischen HDAC- und HAT-Aktivität als ein allgemeiner molekularer Mechanismus innerhalb der malignen Transformation betrachtet werden kann.

1.4 HDAC-Inhibitoren (HDAC-I) - „Biomodulatoren“ mit Antitumoraktivität

Das wachsende Verständnis um die molekularen Mechanismen der Onkogenese und die Zusammenhänge zwischen transkriptioneller Dysregulation der Genexpression und maligner Transformation machen HDAC Enzyme zu potentiellen Angriffspunkten einer zielgerichteten Tumorthherapie und Inhibitoren dieser Enzyme zu hochinteressanten Wirkstoffen mit einer viel versprechenden Antitumorwirkung. Eine Vielzahl heterogener Substanzen ist in der Lage, Histondeacetylasen zu binden und durch die Blockade ihrer enzymatischen Aktivität eine Hyperacetylierung von Histonen zu vermitteln. Die bislang identifizierten HDAC-I können aufgrund ihrer biochemischen Struktur in folgende 5 Subgruppen klassifiziert werden (Abb. 5):

- (1) **Hydroxaminsäuren** bilden eine potente Gruppe von Inhibitoren, die *in vitro* bereits bei nanomolaren Konzentrationen eine ausreichende Aktivität besitzen, um HDAC Enzyme reversibel zu hemmen. Zu dieser Substanzfamilie gehört z.B. Trichostatin A (TSA; Tsuji et al., 1976; Yoshida et al., 1990), ein ursprünglich als Antimykotikum entwickelter Wirkstoff, der zu den ersten identifizierten HDAC-I zählt. Sowohl das ungünstige Toxizitätsprofil als auch die geringe Bioverfügbarkeit *in vivo* limitieren seinen therapeutischen Einsatz, so dass der Wirkstoff heute lediglich als gut charakterisierte Referenz-Substanz für neu entwickelte HDAC-I, wie z. B. die *Suberoylanilide hydroxamic acid* (SAHA) (Richon et al., 1998) dient.
- (2) **Kurzkettige Fettsäuren**, wie z. B. Butyrat (Newmark et al., 1994; Carducci et al., 1997), stellen eine weitere Gruppe von Inhibitoren dar, die HDACs *in vitro* im millimolaren Konzentrationsbereich blockieren können. Trotz der vergleichsweise schwächeren, inhibitorischen Aktivität waren Butyrate und Derivate dieser kurzkettigen Fettsäuren die ersten Substanzen, von denen man viel versprechende Daten aus klinischen Studien gesammelt hat (Carducci et al., 1997). Es wurde beispielsweise von einer Phenylbutyrat-Behandlung eines

APL-Patienten berichtet, der nach mehreren Rezidiven unter Therapie mit All-trans-Retinolsäure und konventionellen Chemotherapeutika, die HDAC-I Therapie erhalten hat, welche in einer kompletten Remission der Leukämie resultierte (Warrell et al., 1998). Trotz dieser ermutigenden Ergebnisse und günstiger *in vivo*-Toxizitätsprofile sind die bisher bekannten Vertreter dieser Substanzgruppe durch ihre kurze Serumhalbwertszeit und ihre vielfältigen Effekte auf andere Enzymsysteme, die Phosphorylierung und Methylierung von Proteinen regulieren, in ihrer klinischen Anwendbarkeit eingeschränkt (Newmark et al., 1994; Carducci et al., 1997).

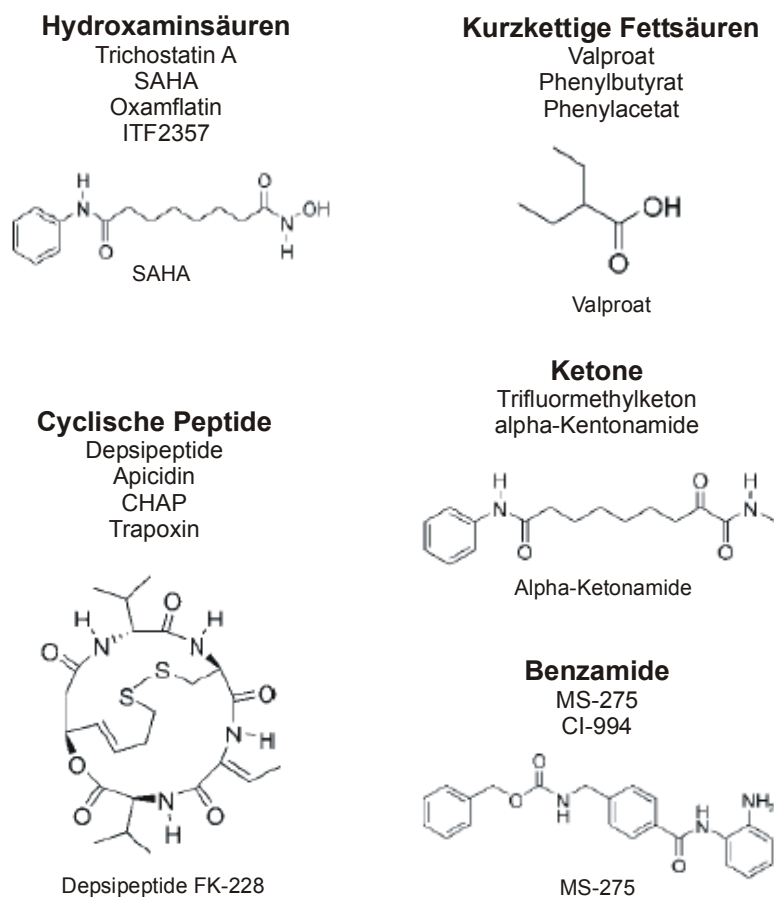


Abb. 5: Chemische Klassen von Histondeacetylase-Inhibitoren (HDAC-I)

(3-5) Weitere strukturelle Klassen von HDAC-I bilden (3) **zyklische Tetrapeptide** (z. B. Trapoxin; Kijima et al., 1993), die (4) **Benzamide** (z. B. MS-27-275; Saito et al., 1999) sowie die Gruppe der (5) **Ketone** (z. B. Trifluoromethylketone; Frey et al., 2002).

In der vorliegenden Arbeit wurden das als Antiepileptikum bekannte und therapeutisch eingesetzte Medikament Valproat (VPA) sowie die neue Substanz ITF2357 als HDAC-I Wirkstoffe verwendet, mit denen ein neuer therapeutischer Ansatz in der Behandlung von HCC-Patienten mit diesen Substanzen ausgearbeitet werden sollte.

VPA gehört strukturell in die Substanzklasse der kurzkettigen Fettsäuren und wurde erst kürzlich als Stoff mit HDAC-I Wirkung identifiziert (Phiel et al., 2001). In verschiedenen Arbeiten konnte gezeigt werden, dass das Antikonvulsivum das Wachstum von Primärtumoren und Metastasen supprimieren und eine Redifferenzierung von Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* hervorrufen kann (Blaheta et al., 2002; Göttlicher et al., 2001). Aufgrund der langjährigen klinischen Erfahrungen beim Einsatz von VPA sowie seinem günstigen *in vivo*-Profil mit einem gut charakterisierten Nebenwirkungsspektrum könnte VPA für Mittel- und Langzeitanwendungen in der Krebstherapie geeignet sein, um z. B. Chemoprävention oder eine Kontrolle bzw. Therapie von Tumorerkrankungen zu erreichen.

Die neu entwickelte, oral verfügbare Substanz **ITF2357**, welche strukturell der Untergruppe der Hydroxaminsäuren angehört, wird derzeit in nicht-onkologischem Kontext klinisch erprobt. Erste Untersuchungen konnten eine HDAC-I Aktivität nachweisen (Mascagni P., unveröffentlichte Daten), so dass ITF2357 in die Untersuchungen dieser Arbeit mit eingeschlossen wurde.

Trotz der strukturellen Vielfalt der hier beschriebenen Substanzen wird den Substanzen mit HDAC-I Aktivität hinsichtlich ihrer Antitumoraktivität die gemeinsame Fähigkeit zugeschrieben, dysregulierte, zelluläre Prozesse in entarteten Zellen therapeutisch beeinflussen zu können.

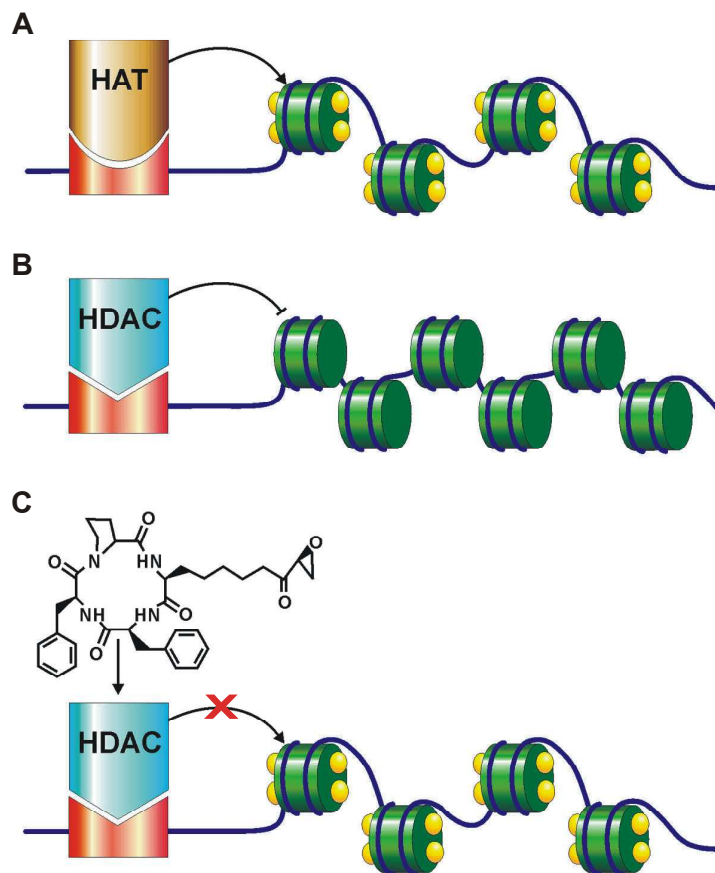


Abb. 6: Molekulare Wirkung von HDAC-I. (A) In gesunden Zellen bindet ein Komplex mit einem intakten Transkriptionsfaktor (blau) und HAT-Aktivität (grün) an spezifische Promotorsequenzen. Die Acetylierung von Histonen (gelb) verändert die Chromatinstruktur so, dass Gene der zellulären Differenzierung transkribiert werden können. (B) In transformierten Zellen können aberrante Transkriptionskomplexe vorliegen (blau), die HDAC-Aktivität (rot) aufweisen. Die transkriptionelle Aktivität von Zielgenen wird durch Chromatinkondensation nach Histondeacetylierung inhibiert und trägt zur Transformation bei. (C) HDAC-I führen zur Akkumulation von acetylierten Histonen mit relaxierter Chromatinstruktur und transkriptioneller Aktivität von Genen mit Wachstums-regulierenden, Differenzierungs- oder Apoptose-induzierenden Eigenschaften.

Der postulierte, allerdings in seinen Einzelheiten noch unvollständig verstandene Mechanismus, durch den die antineoplastische Wirkung von HDAC-I begründet ist, sieht folgendermaßen aus: Eine vermehrte HDAC-Aktivität in Tumorzellen führt zu einer vermehrten Deacetylierung von Histonproteinen, die eine Änderung des Expressionsmusters von Genen bewirkt, die wichtige Funktionen in der Zellzyklus-

Kontrolle oder in der Apoptose-Signaltransduktion ausüben, so dass eine unkontrollierte Zellproliferation und ein unkontrolliertes Tumorwachstum resultieren. HDAC-I können durch eine Erhöhung des Acetylierungsstatus von Histonproteinen die transkriptionelle Regulation dieser Gene wieder rekonstituieren. Hieraus folgt eine Aktivierung von Differenzierungsprogrammen, eine Zellzyklusblockade oder die Induktion des programmierten Zelltodes in Tumorzellen, was als „epigenetische Modulation“ bezeichnet werden kann (Marks et al., 2000; Abb. 5).

Verschiedene cDNA *microarray*-Studien konnten zeigen, dass HDAC-I in Abhängigkeit von Substanz und Zelltyp in der Lage sind, selektiv die Expression von 2-25 % aller Gene zu verändern (Van Lint et al., 1996; Glaser et al., 2003; Peart et al., 2005). Hierbei sind insbesondere Genorte, die für Kontrollproteine des Zellzyklus kodieren, wie z.B. p21^{cip/waf} (Richon et al., 2000) oder Moleküle der intrinsischen oder extrinsischen Apoptosekaskade (Johnstone et al., 2003; Lindemann et al., 2004), wichtige Zielstrukturen fast aller bisher bekannten Substanzen mit HDAC-I Wirkung. Zusätzlich zu diesen Aktivitäten, die das Tumorzellwachstum unmittelbar inhibieren, wurden weitere indirekte Effekte, wie z. B. die Aktivierung der Immunantwort durch Steigerung der Immunogenität des Tumors (Maeda et al., 2000; Magner et al., 2000; Armeanu et al., 2005) oder die Inhibition der Tumorneovaskularisation durch Suppression von Angiogenesefaktoren (Kim et al., 2001) als Teil eines komplexen, HDAC-I vermittelten Reprogrammierungsprozesses beschrieben.

1.5 HDAC-I und *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL)

Epigenetische Veränderungen durch HDAC-I führen in Tumorzellen durch Hoch- bzw. Herunterregulation der Expression Apoptose-regulierender Gene zu einer Senkung der Reizschwelle für apoptotische Signale. Diese Eigenschaft, maligne Zellen gegenüber dem programmierten Zelltod sensibilisieren zu können, macht HDAC-I zu attraktiven Kombinationspartnern, sowohl von konventionellen Chemo-

therapeutika, als auch von neuartigen, potentiell zytotoxischen Substanzen, welche aufgrund von Tumor-eigenen Resistenzmechanismen alleine nicht in der Lage sind, in diesen Zellen effektiv Zelltod auszulösen. Für verschiedene Tumorentitäten konnte bisher gezeigt werden, dass eine Kombinationsbehandlung von HDAC-I und z. B. Etoposid (Kurz et al., 2001; Kim et al., 2003), Camptothecin, Doxorubicin oder Cisplatin (Kim et al., 2003) die Zytotoxizität dieser klassischen Chemotherapeutika effektiv steigern kann, so dass bei den adressierten Tumorzellen erhöhte Todesraten und eine Proliferationsinhibition resultieren.

Neuere Studien mit Leukämiezellen untersuchten die Wirkung einer Kombination von HDAC-I, wie z.B. SAHA (Nakata et al., 2004) oder LAQ824 (Gou et al., 2004) und dem Zytokin *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL). Der Todesligand TRAIL ist ein Mitglied der Tumor-Nekrose-Faktor-Familie, der in der Lage ist, in TRAIL-sensiblen Tumorzellen durch Interaktion mit seinen Todesrezeptoren TRAIL-R1 und TRAIL-R2 (Pan et al., 1997) den extrinsischen Signalweg der Apoptose zu induzieren. Das Zytokin ist derzeit für die onkologische Forschung von größtem Interesse, da TRAIL, im Gegensatz zu anderen Mitgliedern der TNF-Familie, wie FasL (CD95) oder TNF α , selektiv in einer Vielzahl von Tumorentitäten Apoptose induzieren kann, ohne dabei gesundes Gewebe zu schädigen (Walczak et al., 1999; Ashkenazi et al., 1999). Die Untersuchungen von Nakata et al. und Gou et al. in den primär TRAIL-sensiblen Leukämiezellen konnten nachweisen, dass der kombinierte Einsatz von HDAC-I und TRAIL durch synergistische Effekte zwischen beiden Substanzgruppen in einer signifikanten Steigerung einer TRAIL-induzierten Apoptose resultiert.

Trotz dieser vielversprechenden Ergebnisse können komplexe Resistenzmechanismen maligner Zellen gegenüber TRAIL nach wie vor die entscheidende Limitation für einen effektiven Einsatz dieses Zytokins in der Chemotherapie von Malignomen darstellen. Als hierfür prototypische Tumorentität kann z. B. das Hepatozelluläre Karzinom (HCC) angesehen werden, das im Gegensatz zu den meisten, bisher untersuchten Tumorgeweben, eine ausgeprägte Resistenz gegenüber dem Todesliganden TRAIL aufweist (Yamanaka et al., 2000).

Auch wenn die Ursachen für eine derartige TRAIL-Resistenz noch nicht endgültig verstanden sind, kann man davon ausgehen, dass gestörte intrazelluläre Apoptose-Signaltransduktionswege entscheidend zum Schutz der Tumorzelle gegenüber der extrinsischen Apoptose beitragen (Yagita et al., 2004). Da HDAC-I in der Lage sind, durch epigenetische Modifikationen einer transkriptionellen Dysregulation entgegenzuwirken, wurde in der vorliegenden Arbeit die Möglichkeit untersucht, die primäre TRAIL-Resistenz von HCC-Zelllinien durch Behandlung mit VPA bzw. ITF2357 zu überwinden, um die Hepatomzellen auf diesem Weg für eine TRAIL-induzierte Apoptose zu resensibilisieren.

1.6 Zielsetzung

Das Hepatozelluläre Karzinom (HCC) stellt mit weltweit bis zu einer Millionen Todesfällen pro Jahr ein hochrelevantes medizinisches Problem mit einer kontinuierlich ansteigenden Inzidenz dar (Llovet et al., 2003). Die Prognose ist insgesamt als schlecht zu bewerten, wozu entscheidend beiträgt, dass 60-70% der Erkrankungen erst in fortgeschrittenen Krankheitsstadien diagnostiziert werden (Bruix et al., 2002). Neben einer Lebertransplantation in frühen Tumorstadien werden bei fortgeschrittener Erkrankung derzeit lediglich lokale Verfahren (z.B. Radiofrequenzablation, Alkoholinjektion) im Sinne einer palliativen Therapie durchgeführt. Kurative systemische Therapieansätze wie die herkömmliche Chemotherapeutika-Applikation konnten aufgrund der ausgeprägten Resistenz des HCC gegenüber allen bislang getesteten Substanzen keinen überzeugenden Therapiebeitrag leisten (Simonetti et al., 1997; Llovet et al., 2003; Ganne-Carrie et al., 2004; Burroughs et al., 2004), so dass der Untersuchung alternativer Therapiestrategien besondere Bedeutung zukommt.

Als wesentlicher Teil der molekularen Onkogenese beim HCC wird eine veränderte Expression von Genen postuliert, die an Prozessen der Apoptoseinduktion, Zellzyklusprogression und Kontaktinhibition beteiligt sind. Viele dieser Gene können

nach neuen Erkenntnissen gemeinsam durch eine Modulation des sog. „epigenetischen Codes“, der gewissermaßen eine Schalterfunktion erfüllen kann, aktiviert oder deaktiviert werden. Bei der transkriptionellen Regulation dieser Gene scheint der Acetylierungsstatus von Histonen eine große Rolle zu spielen; aktuelle Untersuchungen deuten darauf hin, dass derart transformierte Expressionsmuster durch eine therapeutisch intendierte Hyperacetylierung von zellulären Histonproteinen „repariert“ werden können.

In diesem Dissertationsvorhaben wurden die molekularen Mechanismen der Wirksamkeit einer zielgerichteten Histonhyperacetylierung durch Histondeacetylase-Inhibitoren (HDAC-I) für das als weitgehend Therapie-resistente HCC charakterisiert. Dabei sollten zwei neuartige, bisher wenig bzw. gar nicht in ihrer Funktion als HDAC-I charakterisierte Substanzen, Valproat (VPA) und ITF2357, sowie das bekannte und gut charakterisierte Trichostatin A (TSA) bezüglich ihrer zytotoxischen Wirkung auf HCC-Zelllinien und in Hinblick auf eine Modulation der Apoptose-Signaltransduktion untersucht werden, so dass die Kenntnis dieser Mechanismen die Grundlage für weitere innovative Therapieansätze bilden sollte.

Im Detail sollten untersucht werden:

- Anti-proliferative und Apoptose-induzierende Wirkungen der HDAC-I Wirkstoffe VPA, ITF2357 und TSA auf unterschiedliche HCC-Zelllinien.
- Die HDAC-I vermittelte Modulation von Zellzyklusregulatoren und Apoptose-relevanten Faktoren auf Proteinebene in Hepatomzellen.
- Möglichkeiten einer therapeutisch intendierten Sensibilisierung von Hepatomzellen gegenüber dem Todesliganden TRAIL durch VPA oder ITF2357.
- Charakterisierung von Faktoren, die eine TRAIL-Sensibilisierung von HCC-Zellen durch HDAC-I ermöglichen können.
- Untersuchung der Toxizität für primäre humane Hepatozyten einer (i) HDAC-I-Monotherapie oder (ii) HDAC-I / TRAIL-Kombinationstherapie.

2 Material und Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Laborchemikalien und Enzyme

Standardchemikalien und Enzyme wurden von den Firmen Roth, Fluka, Merk, Sigma-Aldrich und Invitrogen bezogen. Abweichende Bezugsquellen werden gesondert im Text vermerkt.

Alle Chemikalien besaßen mindestens den Reinheitsgrad „zur chemischen Analyse“; sofern erhältlich, wurde der Reinheitsgrad „für die Molekularbiologie“ bzw. „für die Zellkultur“ verwendet.

Der Begriff „Aqua bidest.“ wird im Folgenden für desionisiertes Wasser verwendet, das zusätzlich über eine Milli-Q-Plus-Filtrieranlage (Millipore) gereinigt wurde.

Als „steril“ oder „autoklaviert“ bezeichnete Lösungen und Materialien wurden für 20 min bei 120°C und 2 bar Überdruck autoklaviert (Standautoklav FDV, Fedegari). Als „sterilfiltriert“ bezeichnete Lösungen wurden durch einen 0,22 µm Filter der Firma Sartorius filtriert.

2.1.2 Reagenzien

- HDAC-Inhibitoren:
 - Trichostatin A (TSA, Sigma)
 - Valproat (VPA, Ergenyl®, Sanofi-Synthelabo GmbH)
 - ITF2357 (Bertolini G, Biffi M, Leoni F, Mizrahi J, Pavich G, Mascagni P.; Internationale Patentnummer WO 97/43251, ausgestellt am 12. Mai 1997, Italfarmaco S.P.A., Mailand, Italien)
- Rekombinantes, lösliches TRAIL (beinhaltet die Aminosäurenreste 114-281; Calbiochem)

2.1.3 Verwendete Zelllinien

- HepG2 (Quelle: ATCC, Rockville, USA): Diese Hepatomzelllinie leitet sich von dem Hepatozellulären Karzinom eines männlichen, 15-jährigen Patienten ab.
Verwendetes Kulturmedium: MEM mit DMEM (im Verhältnis 4:1) + 10% FCS + NEAA (*Non-essential amino acids*) + 100 mM Natriumpyruvat + 2 mM Glutamin + 4,5 g/l Glucose. Die Mischung aus MEM und DMEM wurde verwendet, da die Zellen im Gemisch besser wuchsen als in reinem MEM.
- HuH-7 (Quelle: ATCC, Rockville, USA): Diese Hepatomzelllinie stammt von dem Hepatozellulären Karzinom eines männlichen, 57-jährigen Patienten aus Japan.
Verwendetes Kulturmedium: DMEM + 10% FCS + 100 mM Natriumpyruvat + 2 mM Glutamin
- PLC/PRF/5 (Quelle: ATCC, Rockville, USA): Diese Hepatomzelllinie wurde ursprünglich aus dem Hepatozellulären Karzinom eines männlichen, 24-jährigen Patienten isoliert.
Verwendetes Kulturmedium: DMEM + 10% FCS + 100 mM Natriumpyruvat + 2 mM Glutamin
- Hep3B (Quelle: ATCC, Rockville, USA): Diese Hepatomzelllinie leitet sich vom Hepatozellulären Karzinom eines männlichen, 8-jährigen Patienten ab.
Verwendetes Kulturmedium: DMEM + 10% FCS + 100 mM Natriumpyruvat + 2 mM Glutamin
- Primäre humane Hepatozyten (PHH; freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Dr. T. S. Weiss, Zentrum für Leberzellforschung (ZLF), Universitätsklinikum Regensburg, und Dr. M. Schenk, Klinik für Allgemeine, Viszeral- und Transplantationschirurgie, Universitätsklinikum Tübingen): Die Zellen wurden von

Spendern nach Leberteileresektion oder aus nicht-transplantierbaren Lebern nach ZLF-Protokoll gewonnen (Thasler et al., 2003).

Verwendetes Kulturmedium: MEM mit DMEM (im Verhältnis 4:1) + 10% FCS + NEAA + 100 mM Natriumpyruvat + 2 mM Glutamin + Biotin + 4,5 g/l Glucose + 1,66 mU/ml Insulin (Novo Nordisk) + Hydrocortison 3,75 ng/ml (Merck) + 10.000 U Penicillin und 100 U Streptomycin.

2.1.4 Plasmide

- psFFV-Bcl-XL, welches das antiapoptotische Bcl-XL kodiert und aus dem Gerüst von pNeo aufgebaut ist (freundlicherweise zur Verfügung gestellt von Prof. M. Weller, Allgemeine Neurologie, Universitätsklinikum Tübingen)
- pEGFP-N1 (Clontech)

2.1.5 Oligonukleotide („TaqMan-Sonde“)

- FLIP (Assay-on-Demand™ der Firma Applied Biosystems):
Assay ID Hs00153439_m1
Detektierte Sequenz: TGAGACAGAGCTTCTTCGAGACACC
- TRAIL-R1 (Assay-on-Demand™ der Firma Applied Biosystems):
Assay ID Hs00269492_m1
Detektierte Sequenz: TGTGTCCACCAGGATTCATAGATC
- TRAIL-R2 (Assay-on-Demand™ der Firma Applied Biosystems):
Assay ID Hs00187196_m1
Detektierte Sequenz: TCCACCTGGACACCATATCTCAGAA

- GAPDH (Assay-on-Demand™ der Firma Applied Biosystems):
 Assay ID Hs99999905_m1
 Detektierte Sequenz: GGGCGCCTGGTCACCAGGGCTGCTT

2.1.6 Antikörper

- Primär-Antikörper (Ak) für Western-Blotting wurden in folgenden Verdünnungen, Inkubationszeiten und Inkubationsbedingungen eingesetzt:

Table 1: Primär-Antikörper für Western Blotting

<i>Antigen</i>	<i>Ak-Verdünnung</i>	<i>Inkubationszeit</i>	<i>Inkubationstemp.</i>
α-Tubulin, monoklonal (Sigma)	1: 2 000	45 min	RT
Vinculin, monoklonal (Sigma)	1: 10 000	über Nacht	4°C (Kühlraum)
Ac-H3, polyklonal (Biomol)	1: 20 000	über Nacht	4°C (Kühlraum)
Bid, polyklonal (Cell Signaling Technology)	1: 1 000	über Nacht	4°C (Kühlraum)
Bcl-X _L , polyklonal (BD Pharmingen)	1: 2 000	45 min	RT
Bax, polyklonal (Oncogene)	1: 1 000	45 min	RT
FLIP, polyklonal (Bioscience)	1:1 000	45 min	RT

- Sekundär-Antikörper für Western-Blotting wurden in folgenden Verdünnungen, Inkubationszeiten und Inkubationsbedingungen eingesetzt:

Table 2: Sekundär-Antikörper für Western Blotting

<i>Antikörper</i>	<i>Ak-Verdünnung</i>	<i>Inkubationszeit</i>	<i>Inkubationstemp.</i>
HRPO konjugiert Ziege anti Maus (BioRad)	1: 3000	25 min	RT
HRPO konjugiert Ziege anti Rabbit (BioRad)	1: 3000	25 min	RT

- Primär-Antikörper für die FACS-Analyse:
Ak gegen TRAIL-R1 und TRAIL-R2 (zur Verfügung gestellt von Prof. M. Weller, Allgemeine Neurologie, Universitätsklinikum Tübingen)

2.2 Zellbiologische Methoden

2.2.1 Zellkultur

2.2.1.1 Allgemeines

Alle Arbeitsschritte, die steril ablaufen müssen, wurden in einer Sicherheitswerkbank (Herasafe, Haereus) durchgeführt. Medien und Puffer wurden vor Gebrauch im Wasserbad auf 37°C temperiert. Die Kultivierung aller verwendeten Zelllinien erfolgte bei 36,5°C in 5% CO₂-Atmosphäre in Wasser-ummantelten Inkubatoren (Heracell, Haereus).

Materialien:

- Fötale Kälberserum (FCS; Life Technologies)
- Dulbecco Modifiziertes Eagle Medium (DMEM; Life Technologies); es wurde immer die Variante mit hohem Glucosegehalt (4,5 g/l) gewählt.

- Minimal Essential Medium (MEM; Life Technologies)
- 100 mM Natriumpyruvat-Lösung (Biochrom KG)
- 2 mM L-Glutamin (Life Technologies)
- NEAA (Biochrom KG)
- 4,5 g/l D-Glucose
- 40 IE/ml Insulin (Novo Nordisk)
- 1 mg/ml Glucagon (Novo Nordisk)
- 1 mg/ml Hydrocortison (Merck)
- 10 mg/ml Streptomycin
- 10 kU/ml Penicillin
- PBS ohne Ca^{2+} und Mg^{2+} :
 95,5 g Dulbecco PBS-Pulver wurden in 10 l Aqua bidest. gelöst, aliquotiert und autoklaviert. Die Aufbewahrung erfolgte bei 4°C. Die Lösung hatte folgende Zusammensetzung:
 8 g/l NaCl; 1,15 g/l Na_2HPO_4 ; 0,2 g/l KH_2PO_4 ; 0,2 g/l KCl
- Trypsin/EDTA:
 Fertiglösung (Life Technologies), die 0,25 g/l Trypsin enthält; Lagerung bei -20°C. Die einmal aufgetaute Gebrauchslösung wurde bei 4°C aufbewahrt.

2.2.1.2 Auftauen von Zellen

Folgendes Protokoll wurde für alle benutzten Zelllinien verwendet:

Die in flüssigem Stickstoff gelagerten Zellen wurden ins 37°C-Wasserbad überführt und aufgetaut. Die Zellsuspension wurde vorsichtig mit 10 ml FCS-haltigem Medium versetzt und für 2 min mit 200 x g zentrifugiert. Der Überstand wurde abpipettiert und verworfen. Das Zellsediment wurde in 10 ml FCS-haltigem Medium resuspendiert und in eine 260 ml-Zellkulturflasche ausgesät.

2.2.1.3 Zellpassage

Je nach Wachstumsgeschwindigkeit wurden die in Kultur gehaltenen Zelllinien 1-2 mal pro Woche passagiert. Die Passage erfolgte, wenn die Zellen 80% Konfluenz erreicht hatten, nach folgendem Protokoll:

Nach Entfernung des alten Mediums wurden die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen, um Mediumreste zu beseitigen. Anschließend wurde der gesamte Zellrasen durch Zugabe von 2 ml Trypsin/EDTA bedeckt. Wenn sich die Zellen vom Flaschenboden abgelöst und vereinzelt hatten, wurden 4 ml DMEM + 10% FCS zugegeben, die gesamte Zellsuspension aufgenommen, die gewünschte Menge passagiert.

2.2.1.4 Kryokonservierung von Zellen

Materialien:

- Einfriermedium:
70% FCS-freies Medium
20% FCS
10% DMSO
- Kryoröhrchen, 2 ml (Nunc)

Die Zellen wurden trypsiniert und in 10 ml FCS-haltiges Medium aufgenommen. Die Zellsuspension wurde für 2 min mit 200 x g zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 2 ml Einfriermedium resuspendiert, in Kryoröhrchen gefüllt und in den Stickstofftank überführt.

2.2.1.5 Zellzählung mit dem Hämozytometer nach Neubauer

Materialien:

- 0,4%(w/v) Trypanblau (Sigma)
- Hämozytometer nach Neubauer

Die Zellen wurden trypsinisiert und in 5 ml DMEM + 10% FCS aufgenommen. 15 μ l Trypanblau wurden mit 15 μ l Zellsuspension versetzt, gut gemischt und für 5 min inkubiert. Lebende Zellen nehmen den Farbstoff nicht auf, während durch die nicht mehr intakte Plasmamembran toter Zellen der Farbstoff eindringen kann.

Auf das Hämozytometer wurde ein Deckgläschen gelegt und die beiden Kammern mit dem Farbstoff-Zellgemisch befüllt. Die vier Eckquadrate jeder Kammer wurden am Mikroskop (Olympus IMT-2) ausgezählt. Lebende Zellen erschienen weiß auf dunklem Hintergrund.

Bestimmung der Zellzahl:

Ein Eckquadrat einer Kammer entspricht bei aufgelegtem Deckgläschen 10^{-4} cm^3 (0,1 μ l). Durch die Verdünnung der Zellsuspension mit Trypanblau ergibt sich die Zellzahl nach folgender Formel:

$$\text{Zellzahl / ml} = \frac{\text{Durchschnittliche Zellzahl pro Eckquadrat} \times \text{Verdünnungsfaktor} \times 10^4}{10^4}$$

2.2.2 Transfektion

Zum Einbringen von Fremd-DNA in Hepatomzellen wurde die Methode der Lipofektion gewählt, in der DNA-Liposomen-Gemische („Lipoplexe“) eingesetzt werden. Das Lipid-basierte Transfektionsreagenz, welches aus polykationischen

(zur Bindung der DNA) und neutralen Lipiden (zur Membranfusion) besteht, komplexiert die DNA und transportiert diese während der Transfektion in die Zielzelle.

Die in dieser Arbeit beschriebenen Transfektionen wurden mit dem Transfektionsreagenz FuGene-6 der Firma Roche durchgeführt.

Materialien:

- FuGene-6 (Roche)
- OptiMEM[®] -Medium (BioWhitaker)

Je Transfektionsansatz wurden 2 µl FuGene in 40 µl OptiMEM verdünnt. Nach Zugabe von 1 µg zu transfizierender DNA wurde die Lösung gut gemischt und 30 min bei Raumtemperatur (RT) zur Ausbildung der DNA-Liposomen-Komplexe inkubiert.

Von den zu transfizierenden Zellen wurde das Medium abgenommen, die Zellen wurden gewaschen und mit 700 µl Kulturmedium bedeckt. Die Transfektionslösung wurde anschließend tropfenweise auf die zu transfizierenden Zellen gegeben. Für eine Transfektionsdauer ca. 4 h wurden die Zellen im Inkubator bei 37°C weiter kultiviert. Danach erfolgte ein Mediumwechsel.

2.2.3 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie (*Fluorescence activated cell sorting*, FACS-Analyse) stellt eine Methode zur gleichzeitigen Analyse von verschiedenen Parametern an Zellen dar. Es wird aus einem Gemisch aus lebenden oder fixierten Zellen eine Einzelzellsuspension hergestellt, welche im FACS-Gerät (FACS-Calibur, Becton Dickinson) als Tropfenstrom durch einen Laser-Strahl abgetastet wird. Jede Zelle streut das Laser-Licht und emittiert durch diese Anregung Fluoreszenzlicht. Durch

Erfassung der Streu- und Fluoreszenzeffekte ist es möglich, auf unterschiedliche Eigenschaften jedes einzelnen Partikels zu schließen.

Folgenden Parameter werden dabei gleichzeitig bestimmt: die Vorwärts-Streuung (*forward-scatter*) liefert Informationen über die Zell-Größe, die seitliche Streuung (*side-scatter*, 90°) über die Granularität zellulärer Strukturen. Schließlich kann noch die Fluoreszenzintensität bei verschiedenen Wellenlängen erfasst werden.

Mit Hilfe der Lichtstreuung können Zelltod, Zellaggregationen und Zelleigenfluoreszenz vom Fluoreszenzlicht unterschieden werden. Auch die Detektion von fluoreszierenden Proteinen wie GFP oder die Bestimmung der Gesamtzell-DNA für Zellzyklus-Abhängigkeiten oder die Apoptose-Analyse ist möglich. Die erhaltenen Daten wurden mit der Cell Quest-Software (Beckton Dickinson) ausgewertet.

2.2.3.1 Apoptoseuntersuchungen am Durchflusszytometer

Bestimmung der sub2n-DNA-Population nach Nicoletti et al.:

Apoptotische Zellen bilden im Fluoreszenz-Histogramm ein hypodiploides Signal (Nicoletti et al., 1991), durch das sie sich quantifizieren lassen. Für diese Untersuchung wurden die Zellen in einem hypotonen Puffer mit Propidiumiodid inkubiert, so dass die Kerne aus den Zellen freigesetzt wurden und Propidiumiodid sich in die DNA einlagern konnte (Fried et al., 1978).

Materialien:

- Hypotoner Puffer (wurde in 250 ml Aqua bidest. aufgelöst und im Kühlschrank als Stammlösung aufbewahrt):
 - 0,25 g Natriumcitrat
 - 0,75 ml Triton-X 100
 - 0,005 g Ribonuklease A
- 0,025 g Propidiumjodid (wurde unmittelbar vor dem Gebrauch zugesetzt)

Der Überstand der zu untersuchenden Zellkultur wurde in spezielle FACS-Röhrchen (Becton Dickinson) überführt. Der Zellrasen wurde anschließend mit 1 ml PBS gewaschen (diese Fraktion wurde ebenfalls in das FACS-Röhrchen überführt) und mit 300 µl Trypsin/EDTA bei 37°C von der Unterlage abgelöst. Die Trypsin-Reaktion wurde mit 1 ml der vereinigten Fraktionen aus Wasch-PBS und aus abgenommenem Medium gestoppt. Die Zellsuspension wurde zu ihrem Überstand hinzupipettiert und 5 min mit 200 x g abzentrifugiert.

Das Zellpellet wurde in 300 µl hypotonem Propidiumiodidpuffer resuspendiert und nach einer Inkubationszeit von 0,5 - 1 h bei 4°C und unter Ausschluss von Licht am Durchflusszytometer analysiert.

Annexin V-Färbung:

Während des Apoptoseprozesses kommt es zu Veränderungen an der Zellmembran, u.a. wird Phosphatidylserin von der Membraninnenseite auf die Außenseite umverteilt. Annexin V ist ein Ca^{2+} -abhängiges Phospholipid-bindendes Protein mit hoher Affinität zu Phosphatidylserin und kann daher dazu verwendet werden, apoptotische Zellen zu markieren.

Material:

- Annexin-PE (Roche)
- HEPES-Puffer

Annexin V Färbungen wurden mit dem Annexin-PE von Roche durchgeführt. Für die Experimente wurden das Zellpellet in 100 µl HEPES-Bindungspuffer mit 2 µl PE-Annexinlösung resuspendiert, 30 min auf Eis inkubiert und anschließend am Durchflusszytometer (FACS Calibur, Becton Dickinson; Anregung 488 nm; 515 nm Bandpassfilter für die GFP-Fluoreszenz und 600 nm Langpassfilter für die PE-Fluoreszenz) vermessen.

2.2.3.2 Antikörpermarkierung für FACS-Analyse

Materialien:

- Waschlösung:
 - 500 ml PBS
 - 1% BSA
 - 0,05% Natriumazid
- in Waschlösung verdünnte Primärantikörper-Lösung
- in Waschlösung verdünnte Sekundärantikörper-Lösung
- Streptavidin-PE-Lösung

Die Zellen der zu markierenden Kulturen wurden mit 1 ml PBS gewaschen, trypsiniert und mit 1 ml Waschlösung aufgenommen. Die Zellsuspension wurde 5 min mit 200 x g zentrifugiert und das Zellpellet in der jeweiligen Primärantikörperlösung für 30 min bei RT inkubiert.

Das Zellpellet wurde gewaschen und mit der Sekundärantikörperlösung für 30 min bei RT inkubiert. Nach einem erneuten Waschschrift wurde das Zellpellet in 100 µl Streptavidin-PE aufgenommen und für 30 min bei RT inkubiert, anschließend gewaschen und für die Analyse am Durchflusszytometer in 200 µl Waschlösung resuspendiert.

2.3 Proteinchemische Methoden

2.3.1 Zellaufschluss

Materialien:

- Lysepuffer:

0,5% NP-40
20 mM HEPES (pH 7,4)
84 mM KCl
10 mM MgCl₂
0,2 mM EDTA
0,2 mM EGTA
1 mM DTT (wurde ebenso wie die im Folgenden genannten
Proteaseinhibitoren erst unmittelbar vor dem Gebrauch zugesetzt)
5 µg/ml Aprotinin
1 µg/ml Leupeptin
1 µg/ml Pepstatin A
1 mM PMSF

Der Zellrasen wurde mit PBS gewaschen und mit 200 µl Lysepuffer bedeckt. Nach einer 5-minütigen Inkubation wurde der Zellrasen mit einem Zellschaber vom Boden abgelöst. Nach mehrmaligem Auf- und Abpipettieren wurde die Suspension abzentrifugiert, anschließend aliquotiert und bei -80°C eingefroren.

2.3.2 Sulforhodamin B-Assay

Der Sulforhodamin B (SRB)-Assay ist eine empfindliche Methode zur Bestimmung des Gesamtproteingehalts einer Zelle, welcher über einen großen Bereich linear zur Zellzahl ist (Skehan et al., 1990).

Materialien:

- PBS
- 10%-ige Trichloressigsäure (TCA)
- 0,4%-igen Lösung von Sulforhodamin B (Sigma)

- 1%-ige Essigsäure
- 10 mM Tris-Lösung (pH 10,5)

Die zu untersuchenden Zellen wurden in einer 24-Kavitäten-Platte ausgesät und in Vierfachansätzen 5 Tage lang mit verschiedenen Konzentrationen der jeweiligen HDAC-Inhibitoren kultiviert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde der Assay gestoppt; die Zellen wurden folgendem Protokoll unterzogen:

Fixierung der Zellen:

Nach Waschen der Zellen mit kaltem PBS wurden zur Fixierung jeweils 200 µl TCA in die Proben-Kavitäten gegeben und für mindestens 30 min in Kälte (Kühlschrank oder Platten auf Eis legen) inkubiert. Nach der Fixierung wurden die Platten unter fließendem Wasser 4x gewaschen und anschließend bei 40°C für mindestens 12 h getrocknet.

Anfärben der Zellen:

Zum Anfärben wurden in jede Proben-Kavität 250 µl der in 1%-iger Essigsäure aufgelösten SRB-Lösung gegeben. Nach 10 min Inkubation bei RT wurden die Platten mit 1%-iger Essigsäure gewaschen. Das Waschen erfolgte solange, bis die Essigsäure in den Proben-Kavitäten farblos geworden war. Anschließend wurden die Platten bei 40°C für mindestens 3 h getrocknet.

Messung der Extinktion:

Die getrockneten Platten wurden auf Eis gelegt. Pro Proben-Kavität wurden 500 µl der kalten Tris-Lösung pipettiert und für 10 min inkubiert. Anschließend wurden jeweils 80 µl Inhalt jeder Kavität der 24-Kavitäten-Platte in Form von Dreifachbestimmungen in eine 96-Kavitäten-Platte transferiert und im Photometer bei 550 nm (Referenz 630 nm) gemessen.

Bei der Auswertung wurde der Mittelwert der drei Messungen gebildet. Durch den ursprünglichen Vierfachansatz der Zellkulturen bildete der Mittelwert aus 12 Extinktionsmessungen die Grundlage für die quantitative Auswertung des Assays.

2.3.3 Elektrophoretische Auftrennung von Proteinen (SDS-PAGE)

Proteine wurden durch ein von Laemmli, 1970, entwickeltes Verfahren elektrophoretisch aufgetrennt. In Anwesenheit von SDS und β -Mercaptoethanol, also unter denaturierenden Bedingungen, erfolgte die Trennung der Proteine hauptsächlich nach der Größe. SDS wurde als starkes Detergenz verwendet, um alle nicht-kovalenten Wechselwirkungen zu zerstören, mit Hilfe von β -Mercaptoethanol wurden die Disulfidbrücken reduziert.

Als Gelmaterial kam Polyacrylamid zum Einsatz, wobei eine Kombination von zwei Geltypen eingesetzt wurde: Zum einen ein großporiges Sammelgel, in dem die Proteine konzentriert und zu einer scharf begrenzten Zone gesammelt wurden, und zum anderen ein darunter liegendes kleinporiges Trenngel, in welchem die Proteine nach Molekulargewicht getrennt wurden.

Das Trennvermögen dieser diskontinuierlichen Elektrophorese beruht auf der Kombination des Molekularsiebeffekts mit einem Konzentrierungseffekt. Letzterer wird dadurch verursacht, dass sich in Trenn- und Sammelgel andere Ionen (Leitonen: Chlorid-Anionen) als in den Elektrodengefäßen (Folgeionen: Glycinat) befinden und der pH-Wert im Sammelgel niedriger als im Elektrodenpuffer und im Trenngel ist. Die effektive Beweglichkeit aller an der Elektrophorese beteiligten Ionen verhält sich dabei wie folgt: Leitonen > Proteine > Folgeionen. Beim Übergang vom Sammel- zum Trenngel nimmt, infolge des alkalischeren pH-Wertes im Trenngel, die Beweglichkeit der Folgeionen stark zu und erreicht die Beweglichkeit der Leitonen. Damit wandern im Trenngel Leit- und Folgeionen der Proteinschicht voraus.

Materialien:

- Acrylamid (30%): Rotiphorese Gel A (Roth), gebrauchsfertig
- Bisacrylamid (2%): Rotiphorese Gel B (Roth), gebrauchsfertig
- Tris-HCl, 1,5 M (pH 8,7) für Trenngel:

60,55 g Tris Base werden in 400 ml bidest. Wasser gelöst, der pH mittels conc. HCl auf 8,7 eingestellt und die Lösung auf 500 ml aufgefüllt.

- Tris-HCl, 1 M (pH 6,8) für Sammelgel:
12,11 g Tris Base werden in 80 ml bidest. Wasser gelöst, der pH mittels conc. HCl auf 6,8 eingestellt und die Lösung auf 100 ml aufgefüllt.
- SDS (10%):
28,84 g SDS werden in 100 ml bidest. Wasser gelöst.
- Elektrophoresepuffer (5x):
15,1 g Tris Base, 94 g Glycin, 10 g SDS
werden in 900 ml bidest. Wasser gelöst, der pH auf 8,3 eingestellt und auf 1000 ml aufgefüllt (eine 10x Lösung kann aufgrund der mangelnden Löslichkeit des Glycins nicht angesetzt werden). Für die Elektrophorese wurde 100 ml dieser Lösung mit 400 ml Wasser verdünnt.
- APS-Stammlösung (10%):
1 g APS in 10 ml bidest. Wasser. Die Stammlösung wird aliquotiert und bei -20°C gelagert. Die Lösung ist bei -20°C praktisch unbegrenzt haltbar, die Aliquots sollten aber nur einmal aufgetaut werden.
- Probenpuffer (4x):
RotiLoad (Roth), gebrauchsfertig (Zusammensetzung nach Laemmli)
- Molekulargewicht-Standards:
Full Range Recombinant Protein Marker (Amersham; Zusammensetzung nach Laemmli)

Gießen der Gele:

Für 16 x 18 cm Gele (1 mm dick) wurden die entsprechenden Glasplatten (Ohren- und Spacerplatten) je zweimal mit Ethanol (70%) und Aqua bidest. gereinigt. Auf die *Spacer*-Platte wurde erst die Silicondichtung, dann die Ohrenplatte aufgelegt und der Sandwich mit den entsprechenden Klammern fixiert.

- Gießen des Trenngels (10%,12% oder 15%):

<i>Reaktionskomponenten</i>	10%	12%	15%
Aqua bidest.	7,9 ml	5,1 ml	0,9 ml
Gel A (30%)	10 ml	12 ml	15 ml
Gel B (2%)	4 ml	4,8 ml	6 ml
1,5 M Tris-HCl (pH 8,7)	7,5 ml	7,5 ml	7,5 ml
APS (10%)	300 µl	300 µl	300 µl
SDS (10%)	300 µl	300 µl	300 µl
TEMED	12 µl	12 µl	12 µl

Nach Zugabe der beiden letzten Komponenten wurde jeweils kurz gemischt und die Gele sofort gegossen. Direkt nach dem Gießen wurde die Flüssigkeit mit wassergesättigtem n-Butanol überschichtet, um unter Sauerstoff Ausschluss einen geraden Gelrand zu erhalten. Nach ca. 1 h wurde vom polymerisierten Trenngel das n-Butanol abgegossen und mit Aqua bidest. nachgespült, verbliebene Flüssigkeitsreste wurden mit Whatman 3MM Filterpapier abgesaugt.

- Gießen des Sammelgels (4%):

<i>Reaktionskomponenten</i>	4%
Aqua bidest.	6,17 ml
Gel A (30%)	1,7 ml
Gel B (2%)	0,68 ml
1M Tris-HCl (pH 6,8)	1,25 ml
APS (10%)	100 µl
SDS (10%)	100 µl
TEMED	10 µl

Nach Zugabe der letzten beiden Komponenten wurden die polymerisierten Trenngele mit der Sammelgellösung überschichtet. Direkt nach dem Gießen wurden die Probenkämme eingesetzt. Nach ca. 1 h war die Polymerisierungsreaktion vollständig, der Kamm wurde entfernt, evtl. vorhandene Gelreste wurden vorsichtig aus den Taschen mit Aqua bidest. ausgewaschen.

Probenvorbereitung:

Die benötigten Zellysate wurden aufgetaut und jeweils die gewünschte Menge entnommen. Alle Proben sowie der Molekulargewichtsstandard wurden mit Lysepuffer auf das gleiche Volumen (40 µl) gebracht und mit der entsprechenden Menge Probenpuffer (4x) versetzt. Die Proben wurden für 5 min bei 90°C inkubiert, abzentrifugiert und anschließend auf das Gel aufgetragen (vor dem Probenauftrag wurden die Probenaschen mittels einer Spritze mit Laufpuffer gespült und Luftblasen am unteren Gelrand entfernt).

Gel-Lauf:

Das Gelsandwich wurde in die mit Elektrophoresepuffer gefüllte Vertikale Einheit Hoefer SE 400 der Firma Amersham Pharmacia Biotech eingebaut.

Der Probeneinlauf erfolgte in 1 h mit 90 V, die Auftrennung der Proben bei 60 V über Nacht im Kühlraum bei 4°C. Die Elektrophorese wurde abgebrochen, sobald die Bromphenolblau-Bande die untere Gelgrenze erreicht hatte.

2.3.4 Western-Blotting

Zum spezifischen Nachweis von Proteinen wurde in Analogie zu den DNA- und RNA-Nachweisverfahren Southern- und Northern-Blotting eine Methode entwickelt, die als Western Blotting bezeichnet wird (Burnette et al., 1981). Hierbei werden die Proteine zunächst elektrophoretisch aufgetrennt. Anschließend werden die aufgetrennten Proteine im elektrischen Feld vom Gel auf eine Trägermembran

übertragen. Die immobilisierten Proteine werden anschließend mit einem für das nachzuweisende Protein spezifischen Antikörper inkubiert.

Der Nachweis der gebundenen Antikörper kann auf unterschiedliche Weise erfolgen. Durchgesetzt haben sich nicht-radioaktive Methoden, bei denen ein sekundärer Antikörper gegen den Fc-Teil des primären Antikörpers verwendet wird, welcher mit einem Enzym gekoppelt ist, das eine leicht detektierbare Reaktion katalysiert.

2.3.4.1 Proteintransfer

Materialien:

- Transferpuffer (Towbin-Puffer):

2,42 g Tris

11,26 g Glycin

wurden mit 700 ml Aqua bidest. versetzt und auf pH 8,3 eingestellt. Dann wurden 200 ml Methanol zugesetzt und abschließend mit Aqua bidest. auf 1 l aufgefüllt.

- Methanol
- PVDF-Membran (Hybond P, Amersham Pharmacia Biotech)
- Whatman 3MM Filterpapiere

Zur Equilibration der PVDF-Membran wurde diese vollständig mit Methanol benetzt und 1 min inkubiert, dann 5 min in Aqua bidest. zum Entfernen des Methanols unter leichtem Schütteln eingeweicht und abschließend für 10 min in Transferpuffer inkubiert. Vier Whatman 3MM Filterpapiere wurden auf Gelgröße zugeschnitten und ebenfalls in Transferpuffer eingeweicht. Nach erfolgter SDS-PAGE wurde das Sammelgel vollständig entfernt, mit dem Trenngel und der vorbereiteten PVDF-Membran wurde folgende Anordnung in einer Schale aufgebaut:

Lochplatte am Minus-Pol
Schwammtuch
2 Lagen Whatman 3MM Filterpapier
Polyacrylamidgel
PVDF-Membran
2 Lagen Whatman 3 MM Filterpapier
Schwammtuch
Lochplatte am Plus-Pol

Es wurde stets darauf geachtet, dass die einzelnen Lagen luftblasenfrei aufeinander lagen. Die Anordnung wurde in eine mit Transferpuffer gefüllte Trans-Blot Zelle der Firma BioRad übertragen und die Proteine bei einer konstanten Stromstärke von 400 mA im Kühlraum bei 4°C für 100 min auf die Membran transferiert.

2.3.4.2 ECL-Detektionssystem

Das *enhanced-chemiluminescence* (ECL) System ist eine nicht-radioaktive Methode zur Detektion von Meerrettich-Peroxidase. Die Meerrettich-Peroxidase (*horseradish peroxidase*, HRP) oxidiert ein geeignetes organisches Substrat - das Diacylhydrazid Luminol - unter Umsetzung von H_2O_2 zu H_2O . Das Oxidationsprodukt befindet sich in einem angeregten Zustand, aus dem es unter Lichtemission, die mittels Belichtung eines Röntgenfilms sichtbar gemacht wird, wieder in den Grundzustand zurückkehrt. Die Reaktion erreicht ca. 5 min nach Substratzugabe das Maximum der Lichtemission, dann fällt die Signalstärke langsam ab. Die Sekundär-Antikörper sind mit HRP konjugiert, so dass die Position der spezifisch gebundene Antigene auf der Membran als Bande nachgewiesen wird.

Materialien:

- TBS:
150 mM NaCl (8,76 g/l)
13 mM Tris (1,57 g/l)
werden in 900 ml bidest. Wasser gelöst auf pH 7,5 gebracht (am pH-Meter mit HCl; Zielgröße: 32%) und auf 1000 ml aufgefüllt.
- TBS-T:
1 l TBS, pH 7,5 werden mit 0,02% Triton X-100 (200 µl) versetzt.
- Block-Lösung:
Rotiblock-Konzentrat (Roth) 1:10 in bidest. Wasser verdünnt (50-100 ml pro Blot).
- Primärantikörper:
Die Antikörper-Lösung wird im gewünschten Maße in Block-Lösung verdünnt (10-30 ml pro Blot, Tab. 2.1.6).
- Sekundärantikörper (Antikörper-HRP-Konjugat, Alexis):
Die Antikörper-Lösung wird im gewünschten Maße in Block-Lösung verdünnt (30 ml pro Blot, Tab. 2.1.6).
- ECL-Detektionslösungen 1 und 2: Fertiglösungen von Amersham Pharmacia Biotech
- ECL-Hyperfilm (Amersham Pharmacia Biotech)

Blockierung der Membran:

Die Membran wurde mit 20-50 ml Block-Lösung für 1 h bei RT geblockt. Danach wurde die Block-Lösung verworfen.

Antikörper-Inkubation:

Die Verdünnung des jeweiligen Primärantikörpers wurde unmittelbar vor Gebrauch hergestellt, auf die geblockte Membran überführt und nach dem jeweiligen Protokoll inkubiert. Die Antikörper-Verdünnung wurde bei 4°C gelagert und mehrfach verwendet.

Anschließend wurde die Antikörper-Lösung entfernt, Reste wurden mit TBS-T ausgewaschen und dann 3 x 10 min mit je 50 ml TBS-T gewaschen.

Die Verdünnung des Sekundärantikörper-HRP-Konjugates wurde unmittelbar vor Gebrauch hergestellt und auf die gewaschenen Membran überführt. Anschließend wurde für 25-30 min bei RT inkubiert. Die Antikörper-Lösung wurde entfernt, Reste mit TBS-T ausgewaschen und ebenfalls 3 x 10 min mit je 50 ml TBS-T gewaschen.

Detektion:

Die gewaschene Membran wurde auf einen aufgeschnittenen Vernichtungsbeutel (Brand) überführt. Je 2,5 ml ECL-Reagenz 1 und 2 wurden gemischt, auf die Membran aufgegeben und dann für 60 sec inkubiert. Überschüssiges Reagenz wurde durch Abtropfen entfernt, danach wurde die Membran auf einen neuen (in eine Filmkassette geklebten) aufgeschnittenen Vernichtungsbeutel gelegt. Der Beutel wurde zugeklappt; Luftblasen wurden durch Ausstreichen entfernt. In der Dunkelkammer wurde ein ECL-Hyperfilm aufgelegt (es wurde mit 15 sec Belichtungszeit begonnen, bei jedem neuen Film wurde die Belichtungszeit verdoppelt) und anschließend entwickelt.

2.3.4.3 *Strippen* eines Western Blots

Um einen Western Blot nach einer Detektion mit neuen Antikörpern zu beladen und weitere Proteine z.B. ähnlicher Größe nachzuweisen, wurden die gebundenen Antikörper-Konjugate durch ein *Strippen* („Waschen“) der Membran nach folgendem Protokoll entfernt.

Materialien:

- Elutionspuffer:
 - 62,5 mM Tris-HCl (pH 6,7; 20°C)
 - 2% SDS

100 mM DTT

- TBS-T
- Block-Lösung (Rotiblock-Konzentrat von Roth) 1:10 in bidest. Wasser verdünnt

Die Membran wurde in einem Vernichtungsbeutel zusammen mit 30 ml Elutionspuffer eingeschweißt und in einem Wasserbad bei 70°C für 30-90 min inkubiert. Danach wurde die Membran bei RT zweimal jeweils 10 min mit Aqua dest. ausgewaschen, anschließend weitere 10 min mit TBS-T. Nach einer Blockierung von mindestens 2,5 h in der Block-Lösung konnte die Membran erneut mit Antikörpern beladen werden.

2.3.5 Fluorimetrische Bestimmung der Caspaseaktivität

Bei der Aktivierung der Caspasen während der Apoptose werden Proteine mit einer spezifischen Sequenz erkannt und hydrolysiert. Die fluorometrische Bestimmung der Caspase-Aktivität verwendet kurze Peptide mit der jeweiligen spezifischen Sequenz, welche an einem Fluorochrom über Peptidbindung kovalent gebunden sind. Wird die Bindung hydrolysiert, erlangt das Fluorochrom wieder seine Fluoreszenzeigenschaft und kann detektiert werden.

Materialien:

- Lysepuffer (Zusammensetzung: siehe 2.3.1)
- Rx-Puffer (2-fach konzentriert):
 - 100 mM HEPES pH 7,3
 - 200 mM NaCl
 - 20% Sucrose
 - 0,2% CHAPS

4 mM CaCl₂

26,7 mM DTT (wurde unmittelbar vor Gebrauch zugesetzt)

- Caspasesubstrat 50 mM DEVD-AMC (N-Acetyl-Asp-Glu-Val-Asp-Aminomethylcoumarin, Bachem)

Jeweils 50 µl des mit Hilfe des Lysepuffer gewonnenen Zelllysates wurden in eine 96-Kavitäten-Platte überführt, diese wurde anschließend für 10 min auf Eis gelagert. Der Rx-Puffer wurde 1:1 mit Aqua bidest. verdünnt, je Reaktionsansatz wurden 150 µl Rx-Puffer mit 2,8 µl DEVD-AMC versetzt.

Nach Zugabe dieser Substratlösung zum Zelllysat wurde die Caspase-Aktivität bestimmt, indem die proteolytische Spaltung von Aminomethylcoumarin fluorometrisch mittels einer Anregungswellenlänge von 360 nm bei einer Emissionswellenlänge von 475 nm gemessen und in einem Messzeitraum von 4 h bei 37°C jede zweite Minute erfasst wurde. Die Caspase-Aktivität wurde als Steigung dieser Kurve in der linearen Regression und als Zunahme der arbiträren Fluoreszenzeinheiten pro Minute angegeben.

Zur Bestimmung der spezifischen Caspase-Aktivität wurde nach Beendigung der Messung eine Proteinbestimmung nach Bradford mit den entsprechenden Zelllysaten durchgeführt. Die spezifische Aktivität wurde durch Teilung der Caspase-Aktivität mit der Proteinmenge im Lysat berechnet.

2.3.6 Proteinbestimmung nach Bradford

Die Proteinbestimmung nach Bradford (1976) stellt eine einfache, schnelle und sensitive Methode dar, mit der im Extinktionsbereich bis 595 nm die Extinktionswerte einer Eichreihe mit einer Regressionsgerade gut beschrieben werden konnten.

Materialien:

- Bradford-Arbeitslösung:
1 Teil Bradford-Reagenz (Biorad) mit 4 Teilen Aqua bidest. verdünnen (Lagerung bei 4°C. mit Whatman-Papier filtrieren, etwa zwei Wochen haltbar)
- BSA-Standard 100 µg/ml (Biorad)

In dieser Arbeit wurde der colorimetrische Protein Assay der Firma BioRad verwendet und entsprechend den Angaben des Herstellers angewandt.

Nach Erstellen einer Eichkurve mit Hilfe von BSA-Lösungen mit definierten Proteinkonzentrationen (1 mg/ml, 0,75 mg/ml, 0,5 mg/ml, 0,25 mg/ml) wurden Doppelbestimmungen der zu untersuchenden Proben bei 595 nm durchgeführt und die Proteinkonzentrationen mittels der erstellten Eichgerade ermittelt.

2.3.7 Laktat-Dehydrogenase(LDH)-Assay

Die Laktat-Dehydrogenase(LDH)-Bestimmung mit Hilfe des *in vitro*-Toxikologie-Assay Kits (Sigma) ist eine akkurate Methode, um die Zytotoxizität unbekannter Substanzen *in vitro* zu testen. Bei dieser Messmethode wird die Membranintegrität von Zellen als eine Funktion der LDH-Freisetzung ins Kulturmedium gemessen.

Der Assay beruht auf der Reduktion von NAD durch LDH-Aktivität. Das dabei reduzierte NAD wird von dem Enzym Diaporase zur Oxidation von Resofurin verwendet. Es entsteht ein farbiges Resofurinderivat, dessen Adsorption bei 450 nm bestimmt wird (GeniosPLUS, Tecan). Die LDH-Aktivität wird mittels einer Standardkurve errechnet. Das freigesetzte LDH bzw. die Menge des reduzierten NAD werden durch eine Farbreaktion photometrisch messbar gemacht.

Materialien:

- Kit-Komponenten:

LDH-Assay-Substratlösung (25 ml)

LDH-Assay-Enzympräparation (25 ml)

LDH-Assay-Farbstofflösung (25 ml)

LDH-Assay-Lysepuffer (10 ml)

Der Assay-Mix wurde nach Protokoll des Herstellers aus gleichen Teilen Substrat-, Enzym- und Farbstofflösung angesetzt (Ansatz unmittelbar vor Gebrauch)

- 1 N HCl

Nach Zentrifugation der 6-Kavitäten-Platten bei 250 x g wurden von jeder Probe jeweils 50 µl Mediumüberstand in eine 96-Kavitäten-Platte pipettiert und mit jeweils 50 µl des Assay-Mix für 20-30 min bei RT unter Ausschluss von Licht inkubiert. Die Reaktion wurde mit 10 µl 1N HCl gestoppt. Die photometrische Messung der Extinktionen erfolgte bei einer Wellenlänge von 490 nm (Referenz 690 nm).

2.3.8 ALT- und AST- Assay

Materialien:

- BayerADVIA-Kit für ADVIA 2400-Analyser

Der Kulturüberstand von PHH und HepG2-Zellen wurde gesammelt und anschließend im Zentrallabor des Universitätsklinikums Tübingen mit Hilfe des kommerziellen ELISA-Kits BayerADVIA ALT- und AST-Aktivitätsbestimmungen auf dem ADVIA Analyser 2400 (Fernwald) unterzogen.

2.4 Molekularbiologische Methoden

2.4.1 Isolierung von Gesamt-RNA aus adhärennten Zellen

Um Gesamt RNA aus adhärennten Zellen zu gewinnen, wurde der NucleoSpin® RNA II Kit der Firma Macherey-Nagel verwendet.

Materialien:

- Kit-Komponenten:
 - RA1-Puffer
 - RA2-Puffer
 - RA3-Puffer
 - MDB (*membrane desalting buffer*)
 - RNase-freie DNase I
 - DNase-Reaktionspuffer
 - RNase-freies Wasser
- 70% Ethanol
- β -Mercaptoethanol
- 0,9 mm Nadel (20 gauge; Braun)

Bis zu 5×10^6 adhärennte Zellen wurden mit PBS gewaschen, trypsiniert und durch Zentrifugation pelletiert. Zur Zellyse wurde das Pellet in 350 μ l RA1-Puffer und 3,5 μ l β -Mercaptoethanol resuspendiert.

Das gewonnene Lysat wurde durch 5-maliges Auf- und Abziehen mit einer 0,9 mm Nadel (20 gauge) homogenisiert und nach Auftragen auf eine Filtrationssäule (NucleoSpin® Filter unit) durch einminütige Zentrifugation bei 11 000 x g filtriert.

Das Lysat wurde mit 350 μ l Ethanol (70%) vermischt und nach Beladen der RNA-Isolationssäule (NucleoSpin® RNA II column) 30 sec bei 8000 x g zentrifugiert. Zur Entsalzung der Säulenmembran wurden anschließend 350 μ l MDB hinzugefügt und die Membran 1 min bei 11 000 x g getrocknet. Für die folgende DNase-Reaktion wurden 10 μ l DNase I zu 90 μ l DNase-Reaktionspuffer gegeben und

gemischt, danach wurden 95 µl des Reaktionsgemisches direkt auf die Säule aufgetragen und für 15 min bei RT inkubiert.

Nach drei Waschschritten mit RA2- und RA3-Puffer wurde die Membran durch zweiminütige Zentrifugation bei 11 000 x g getrocknet, die isolierte RNA wurde in 60 µl RNase-freiem Wasser nach 1 min bei 11 000 x g eluiert.

2.4.2 c-DNA-Synthese

Bei der Synthese von komplementärer DNA (cDNA) durch das Enzym Reverse Transkriptase dient die isolierte Gesamt-RNA (siehe 2.4.1) als Matrize. Durch den Einsatz von Oligo(dT)-Primern, welche an den polyA-Schwanz von mRNAs binden, wird spezifisch mRNA in cDNA umgeschrieben.

Die in dieser Arbeit eingesetzte cDNA-Synthesereaktion mit Hilfe von SuperScript™II RT der Firma Invitrogen konnte für einen Gesamt-RNA-Gehalt von 1-5 µg verwendet werden.

Materialien:

- Oligo(dT)₁₆ (500 µg/ml)
- 10 mM dNTP-Mix: 10 mM dATP, dGTP, dCTP, dTTP
- 5x First Strand Buffer
- 0,1 M DTT
- RNaseOUT™ (40 U/ µl) (RNase Inhibitor)
- SuperScript™II RT
- RNase-freies Wasser

Für einen 20 µl Ansatz wurden 2 µl Oligo(dT)₁₆, 1 µl dNTP-Mix und das jeweilige Volumen der Gesamt-RNA-Lösung gemischt und mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 12 µl gebracht.

Die Reaktionslösung wurde im Gene Amp PCR-Cycler der Firma Eppendorf für 5 min bei 65°C erhitzt und anschließend auf Eis gekühlt. Nach kurzer Zentrifugation wurden dem Ansatz 4 µl 5x First Strand Buffer, 2 µl 0,1 M DTT und 1 µl RNaseOUT™ hinzugefügt; dieser wurde nach sorgfältigem Mischen im Cycler für 2 min bei 42°C inkubiert.

Nach Zugabe von 1 µl SuperScript™II RT wurde die Reaktionslösung für weitere 50 min bei 42°C inkubiert. Die Inaktivierung der Reaktion erfolgte durch 15-minütiges Erhitzen der Probe auf 70°C.

2.4.3 Quantitative RT-PCR

Die Methode der quantitativen RT-PCR wurde in dieser Arbeit herangezogen, um die Expression von Genen in der Zelle zu detektieren und zu quantifizieren. Hierzu wurde zunächst die Gesamt-RNA aus Zellen nach 2.4.1 isoliert und cDNA (siehe 2.4.2) synthetisiert.

Die entstandene cDNA diente anschließend als Probe in einer PCR-Reaktion, bei der durch Zugabe von spezifischen Primern und TaqMan-Sonden (2.1.5) aus dem hier verwendeten Two-Step RT-PCR Kit Assay-on-Demand™ der Firma Applied Biosystems gezielt die gesuchte cDNA vervielfacht wurde.

Materialien:

- 2x TaqMan® Universal Master Mix (Applied Biosystems)
- 20x Assay-on-Demand™ Gene Expression Assay Mix (Applied Biosystems)
- Nuklease-freies Wasser

Folgender Reaktionsansatz wurde gemäß den Angaben des Herstellers für eine 20 µl-Standardreaktion verwendet:

<i>Reaktionskomponenten</i>	<i>Volumen/Kavität (20 µl-Reaktionsvolumen)</i>	<i>Endkonzentration</i>
TaqMan® Universal PCR Master Mix (2x)	10	1x
20x Assay-on-Demand™ Gene Expression Assay Mix cDNA (in Nuklease-freiem Wasser verdünnt)	1 9	1x

Die Reaktionsansätze wurden in den PCR-Cycler (ABI PRISM ® Sequence Detection Systems 7000, Applied Biosystems) überführt und folgendem Programm unterzogen:

<i>Programmschritt</i>	<i>Dauer</i>	<i>Temperatur</i>
Initiales Setup	10 min	95°C
40 Zyklen, je Zyklus		
• Denaturierung	15 sec	95°C
• Annealing/Extension	1 min	60°C

Jede PCR-Reaktion wurde in Dreifachansätzen durchgeführt. ΔC_T wurde ermittelt, indem der durchschnittliche GAPDH C_T -Wert von dem durchschnittlichen FLIP C_T substrahiert wurde.

Die relative Expressionsveränderung wurde nach der Formel $2^{-\Delta\Delta C_T}$ berechnet, nachdem $\Delta\Delta C_T$ als Differenz der ΔC_T -Werte von HDAC-I-behandelten versus unbehandelten Kontrollzellen ermittelt worden war. Die Standarddeviation der ΔC_T -Werte wurde nach der Formel $s = (s_1^2 + s_2^2)^{0,5}$ kalkuliert, wobei s_1 bzw. s_2 die Standarddeviationen der berechneten C_T -Werte darstellen.

3 Ergebnisse

3.1 Histonhyperacetylierung in Hepatomzellen durch VPA und ITF2357

Um das in seiner Funktion als HDAC-I nur wenig charakterisierte Antiepileptikum VPA sowie die neue Substanz ITF2357 in Hinblick auf ihre Fähigkeit zu untersuchen, die Aktivität von HDAC Enzymen in Hepatomzellen effizient zu inhibieren, wurden HepG2-Zellen für 24 h mit 0,2 μ M ITF2357 oder 1 mM VPA kultiviert und anschließend durch Western Blotting mit Antikörpern gegen acetyliertes Histon H3 (Ac-H3) untersucht.

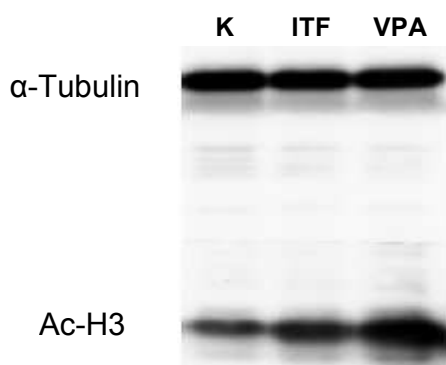


Abb. 7: Westernblot auf Ac-H3 in HepG2-Zellen nach 24 h Inkubation mit 0,2 μ M ITF2357 (ITF) oder 1 mM VPA (VPA) oder ohne HDAC-I (K). Der Nachweis gleichmäßiger Proteinbeladung erfolgte durch Detektion von Tubulin auf demselben Blot.

Wie in Abb. 7 dargestellt, konnte eine, verglichen zu Kontrollzellen (K; Bande 1), erhöhte Acetylierungsstatus nach einer 24-stündigen Inkubation mit HDAC-I nachgewiesen werden. Während ITF2357 (ITF; Bande 2) lediglich einen moderaten Anstieg zur Folge hatte, zeigten die Zellen die stärkste Akkumulation von acetyliertem Histon H3 nach VPA-Exposition (VPA; Bande 3).

3.2 Antiproliferative Wirkung von VPA und ITF2357 auf Hepatomzellen

Da verschiedenen HDAC-I in anderen Tumorzell-Systemen eine wachstumshemmende Wirkung zugeschrieben werden konnte, sollte die Empfindlichkeit der drei humanen Hepatomzelllinien HepG2, PLC/PRF/5 und HuH-7 gegenüber unterschiedlichen Konzentrationen von VPA, ITF2357 und weiteren HDAC-I überprüft werden.

Als Nachweismethode einer Proliferationsinhibition wurde der kolorimetrische Sulforhodamine B Test (SRB-Assay) eingesetzt. Zu diesem Zweck wurden die verschiedenen Zelllinien 5 Tage mit zweimaligem Mediumwechsel zur Zugabe von jeweils frischen HDAC-I Substanzen kultiviert. Die Zellmasse, welche mit der Viabilität der Zellen eng korreliert, wurde mit SRB gefärbt und photometrisch quantifiziert, wobei die IC_{50} , die Konzentration der HDAC-I Substanzen angibt, mit der eine 50-%ige Reduktion der Zellmasse im SRB-Assay erfassbar war.

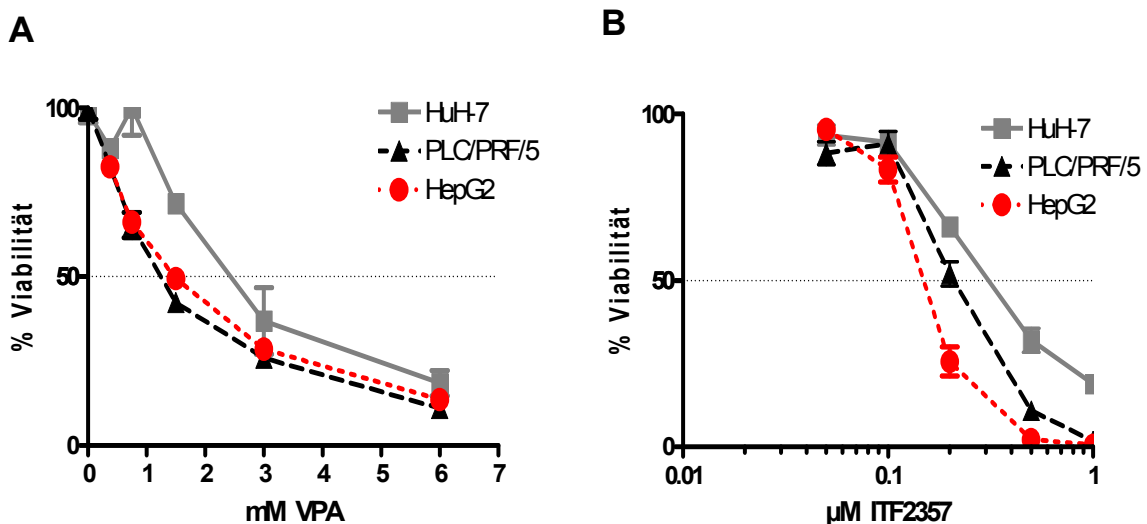


Abb. 8: Photometrische Bestimmung der Zellviabilität von HuH-7, PLC/PRF/5 und HepG2 nach 5-tägiger Behandlung mit aufsteigenden Konzentrationen von VPA (A) oder ITF2357 (B) im SRB-Assay. Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 Experimenten und die einfache SD.

Durch VPA-Exposition im millimolaren Bereich (Abb. 8 A) sowie durch Inkubation mit ITF2357 im mikromolaren Bereich (Abb. 8 B) konnte jeweils eine konzentrationsabhängige Abnahme der Zellviabilität in allen untersuchten Hepatomzellen festgestellt werden. Auch wenn das Reaktionsmuster der unterschiedlichen HCC-Zelllinien nach Inhibition der HDAC-Aktivität ähnlich war, variierte doch die Sensitivität der einzelnen Zelllinien im Hinblick auf die jeweils eingesetzten Substanzen. So wiesen HepG2- und PLC/PRF/5-Zellen eine höhere Empfindlichkeit gegenüber den getesteten Substanzen auf als HuH-7 Zellen. Die IC_{50} bewegte sich in Abhängigkeit von der jeweiligen Zelllinie zwischen 1 mM und 2,5 mM für VPA sowie zwischen 0,15 μ M und 0,3 μ M für ITF2357 (Tabelle 3). Basierend auf diesen Ergebnissen wurden die Konzentrationen für weitere Experimente mit 1 mM und 2 mM VPA sowie 0,2 μ M und 0,5 μ M ITF2357 gewählt. Analoge Untersuchungen von bekannten und etablierten HDAC-I aus der Gruppe der Hydroxaminsäuren, die wie ITF2357 bereits im mikromolaren Konzentrationsbereich wirksam sind (TSA und SAHA; Tabelle 3), dienten für Vergleichsmessungen.

Tabelle 3: Proliferationsinhibition in HCC-Zelllinien durch HDAC-I. Die IC_{50} ist die Konzentration der HDAC-I, mit der eine 50-%ige Reduktion der Zellmasse im SRB-Assay nachweisbar ist.

HDAC-I	HCC-Zelllinie	IC_{50}
Valproat (VPA)	PLC/PRF/5	1,3 mM
	HuH-7	2,5 mM
	HepG2	1,7 mM
Trichostatin A (TSA)	PLC/PRF/5	1,0 μ M
	HuH-7	0,5 μ M
	HepG2	0,4 μ M
ITF2357	PLC/PRF/5	0,15 μ M
	HuH-7	0,3 μ M
	HepG2	0,15 μ M

	PLC/PRF/5	2 μ M
Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA)	HuH-7	2 μ M
	HepG2	1,75 μ M

3.3 Apoptoseinduktion in Hepatomzellen durch HDAC-Inhibition

Im Rahmen der detaillierten Charakterisierung der antiproliferativen Wirkung von VPA und ITF2357 sollte als nächster Schritt eine mögliche Apoptoseinduktion durch VPA und ITF2357 detektiert und ggf. quantifiziert werden. TSA als ein gut charakterisierter HDAC-I Wirkstoff wurde als Positivkontrolle in alle Experimente mit eingeschlossen. Das Auftreten von apoptotischem Zelltod wurde zunächst durch die Quantifizierung der sub2n-DNA im Durchflusszytometer (FACS-Analyse) bestimmt.

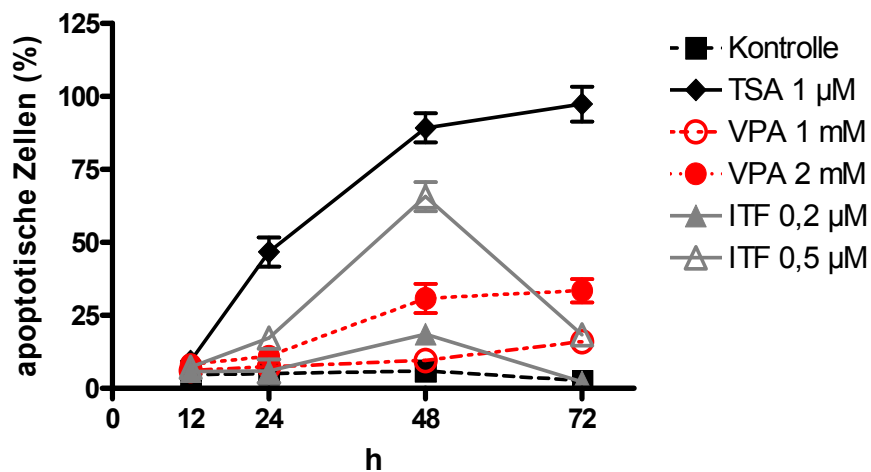


Abb. 9: Zeitlicher Verlauf der Apoptoseinduktion bei HepG2-Zellen, entweder unbehandelt (Kontrolle) oder nach Behandlung mit 1 μ M TSA, 1 mM oder 2 mM VPA, sowie 0,2 μ M oder 0,5 μ M ITF2357. Bestimmung der Rate an Zellen mit sub2n-DNA Gehalt in % der untersuchten Zellen nach 12 h, 24 h, 48 h und 72 h. Dargestellt sind Mittelwerte aus 2 Versuchen und die einfache SD.

Die Apoptoserate (Anteil von Zellen mit sub2n-DNA Gehalt) wurde für alle drei Substanzen (TSA, VPA, ITF2357) zu unterschiedlichen Zeitpunkten zwischen 12 und 72 h Inkubationsdauer untersucht (Abb. 9). Hierbei zeigten sich nach 24-stündiger Inkubation, abgesehen von den TSA-behandelten Kulturen, lediglich geringe apoptotische Phänomene verglichen zu den unbehandelten Kontrollzellen. Während sowohl TSA mit weit über 90% apoptotischer Zellen als auch VPA mit konzentrationsabhängigen 15% (VPA 1 mM) bis 33% (VPA 2 mM) sub2n- Populationen das Maximum ihrer Wirkung erst nach 72 h erreichten, zeigte ITF2357 schon 24 h früher maximale Apoptoseraten: bereits nach 48-stündiger ITF2357-Exposition konnten Zellraten mit sub2n-DNA von 19% durch 0,2 μ M ITF2357 und 66% durch 0,5 μ M ITF2357 detektiert werden. Diese Beobachtung könnte mit einer kürzeren Halbwertszeit von ITF2357 in der Zellkultur zusammenhängen; dieser Effekt wurde jedoch nicht weiter untersucht. Da auch nach einer 72-stündigen Behandlung mit TSA und VPA lediglich ein leichter Anstieg in der Apoptoserate gegenüber dem 48 h-Wert zu verzeichnen war, wurde die Inkubationszeit für weitere Experimente auf 48 h festgelegt.

Als nächster Schritt sollte die Apoptoseinduktion auch in weiteren HCC-Zelllinien nachgewiesen und quantifiziert werden. Zu diesem Zweck wurden HepG2-, HuH-7- und PLC/PRF/5-Zellen für 48 h mit 1 μ M TSA, 1 mM und 2 mM VPA sowie 0,2 μ M und 0,5 μ M ITF2357 inkubiert. Die FACS-Analyse ergab, dass HepG2-Zellen, wie schon im SRB-Assay, die höchste Empfindlichkeit gegenüber allen applizierten HDAC-I aufwiesen: ein 15-facher Anstieg der sub2n-DNA Population (im Vergleich zur Kontrolle) und damit der am stärksten ausgeprägte Apoptose-induzierende Effekt wurde nach TSA-Behandlung beobachtet. Deutlich erhöhte Apoptoseraten konnten jedoch auch mit 2 mM VPA (5,2-fache Erhöhung) oder 0,5 μ M ITF2357 (11,1-facher Anstieg) erzielt werden (Abb. 10 A).

HuH-7-Zellen zeigten ein ähnliches Reaktionsmuster mit den stärksten apoptotischen Effekten nach TSA-Exposition (5,2-facher Anstieg der sub2n-DNA-Population im Vergleich zur Kontrolle), moderaten Apoptoseraten nach Inkubation

mit 2 mM VPA (2,2 fache Erhöhung) und oder 0,5 μ M ITF2357 (2,8 fache Erhöhung).

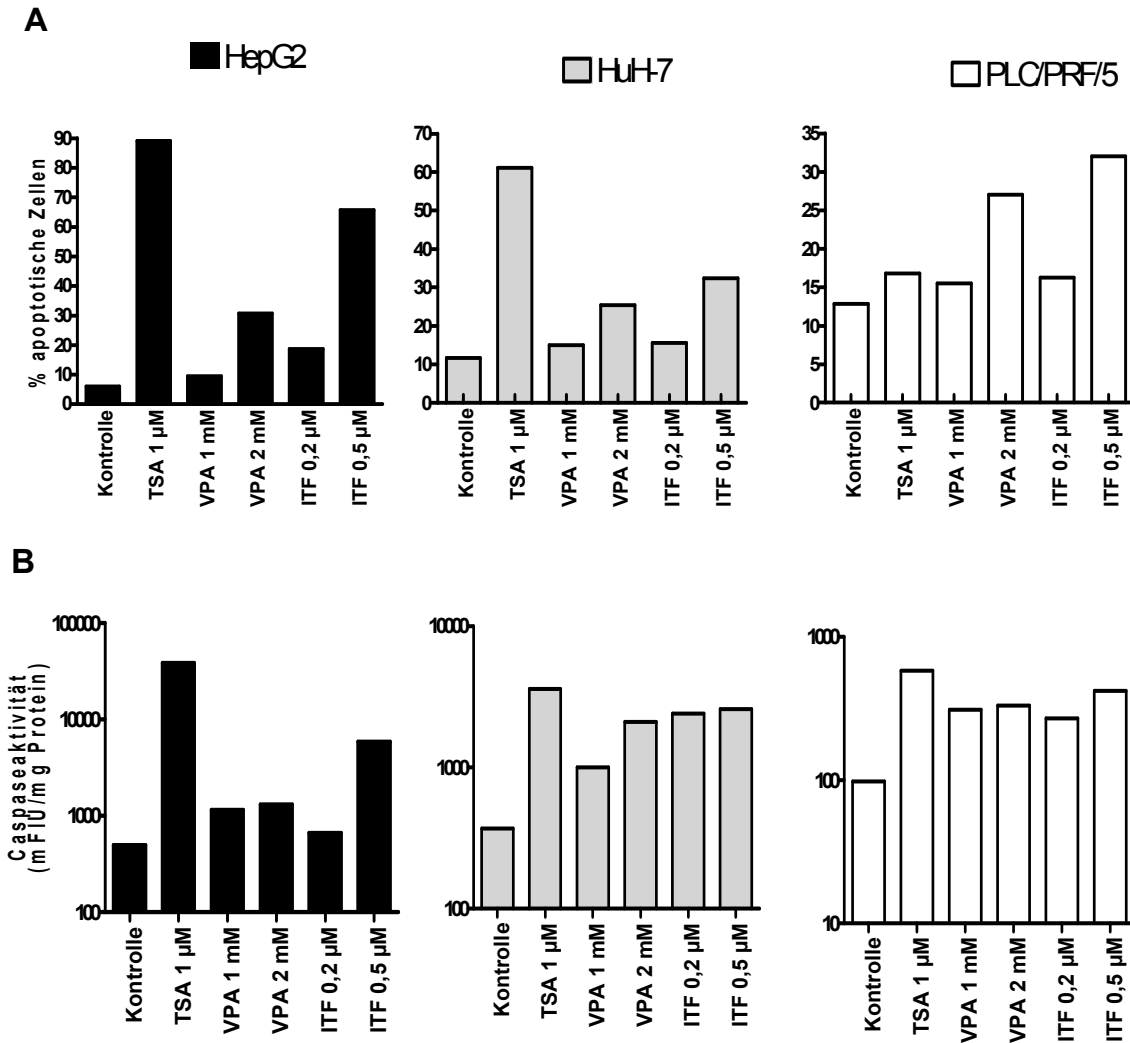


Abb. 10: HDAC-I induzierte Apoptosephänomene in humanen Hepatomzellen. (A): Durchflusszytometrische Bestimmung der sub2n-DNA Rate in % der untersuchten Zellen nach 48 h Inkubationszeit von HepG2-, HuH-7- und PLC/PRF/5-Zellen mit 1 μ M TSA, 1 mM oder 2 mM VPA, sowie 0,2 μ M oder 0,5 μ M ITF2357. Als Kontrolle wurden Zellen ohne HDAC-I im Überstand untersucht (Kontrolle). (B): Fluorimetrische Messung der intrazellulären Caspase-3 Aktivität nach 48 h Inkubation von HepG2-, HuH-7- oder PLC/PRF/5-Zellen mit 1 μ M TSA, 1 mM oder 2 mM VPA, sowie 0,2 μ M oder 0,5 μ M ITF2357 oder ohne Zugabe von HDAC-I (Kontrolle).

Im Gegensatz zu den genannten HCC-Zelllinien reagierten PLC/PRF/5-Zellen mit einem unterschiedlichen Empfindlichkeitsspektrum auf TSA, VPA und ITF2357. Während nach TSA-Exposition, im Gegensatz zu HepG2- und HuH-7-Zellen, nur eine tendenziell leicht erhöhte Rate von Zellen mit sub2n-DNA detektiert wurde, konnte durch Kultivierung der Zellen mit 2 mM VPA eine 2,1-fache und durch Inkubation mit 0,5 μ M ITF2357 eine 2,5-fache Erhöhung der sub2n-DNA-Population nachgewiesen werden.

Die Detektion von sub2n-DNA in apoptotischen Zellen stellt innerhalb der Apoptosekaskade ein spätes Ereignis dar. Wesentlich früher werden in der Regel Caspasen aktiviert, die durch proteolytische Spaltung eine wichtige Rolle als „Vollstrecker“ des apoptotischen Zelltodes spielen. In weitgehender Übereinstimmung mit den FACS-Daten zeigte die fluorimetrische Messung der Enzymaktivität nach 48-stündiger Inkubation mit TSA, VPA oder ITF2357 (Abb. 10 B) einen Anstieg der Caspase-3-Aktivität in allen Zelllinien analog zur Intensität der Rate an sub2n-DNA aus dem vorherigen Experiment. Zusammenfassend konnte damit mit zwei unabhängigen Methoden gezeigt werden, dass Substanzen mit HDAC-I Aktivität in allen untersuchten HCC-Zelllinien Apoptose induzieren können. Das Ausmaß des apoptotischen Zelltodes variiert jedoch in Abhängigkeit einer bisher nicht näher charakterisierten Empfindlichkeit der einzelnen Zelllinie gegenüber der spezifischen Substanz.

3.4 Toxizität der HDAC-I Wirkstoffe VPA und ITF2357 für primäre humane Hepatozyten

Voraussetzung für eine therapeutische Anwendung von HDAC-I im Kontext des HCC sind eine effiziente Proliferations- und Apoptoseinduktion in Hepatomzellen; im Gegensatz hierzu dürfen bei nicht-malignen primären humanen Hepatozyten keine vergleichbaren Phänomene nachweisbar sein. Als nächster Schritt wurden daher die Auswirkungen einer VPA- bzw. ITF2357-Behandlung bei nicht-malignen

primären humanen Hepatozyten (PHH) mittels verschiedener Toxizitätsuntersuchungen bestimmt.

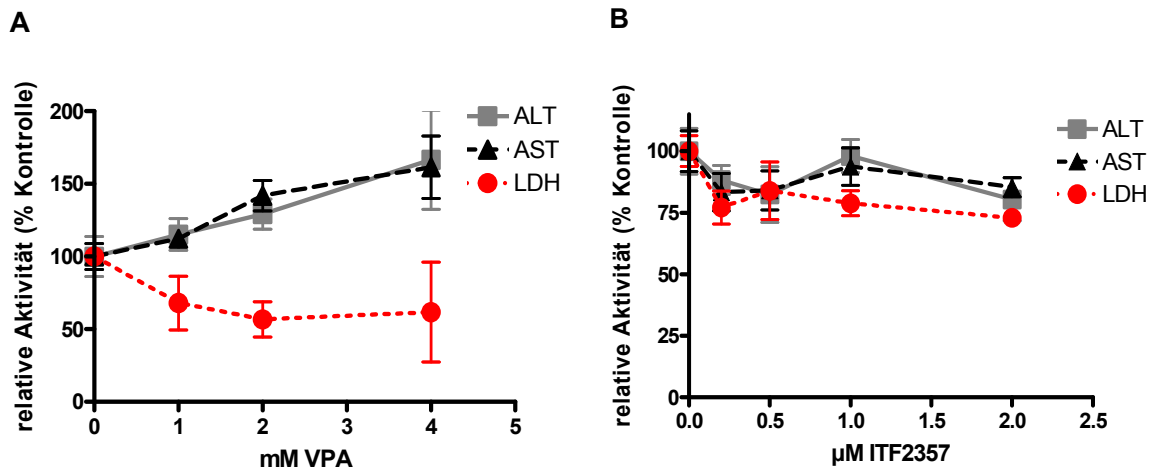


Abb. 11: Toxizitätsprofil von VPA und ITF2357 auf primären humanen Hepatozyten (PHH). Bestimmung der ALT-, AST- und LDH-Aktivität in Überständen von PHH nach Inkubation der Zellen mit aufsteigenden Konzentrationen von VPA (A) und ITF2357 (B). Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen und die einfache SD.

Zunächst wurden PHH eines einzigen Spenders in vier unabhängigen Versuchen für 48 h jeweils mit aufsteigenden Konzentrationen von VPA (1 mM bis 4 mM) und ITF2357 (0,2 µM bis 2 µM) inkubiert. Anschließend wurden die Kulturüberstände bezüglich ihrer enzymatischen Aktivität an Alanin-Aminotransferase (ALT), Aspartat-Aminotransferase (AST) und Laktat-Dehydrogenase (LDH) quantifiziert. ALT und AST sind sensitive Indikatorenzyme für eine Schädigung von Leberzellen, wobei AST im Zytoplasma und in Mitochondrien, ALT ausschließlich im Zytoplasma intrazellulär zu finden ist. Die Freisetzung von LDH findet i.d.R. bei schwerwiegenden Schädigungen der Zellmembran-Integrität statt und deutet daher auf eine mehr fortgeschrittene Zellschädigung hin.

Wie in den Abb. 11 A und 11 B dargestellt, nahm die LDH-Aktivität, welche mit einer zunehmenden Zellschädigung korreliert, verglichen zu den Kontrollzellen

auch bei den höchsten Konzentrationen von VPA und ITF2357 ab. Für die Enzyme ALT und AST konnte ein anderes Reaktionsmuster beobachtet werden: während die ITF2357-Exposition verglichen zur Kontrolle in keiner der applizierten Konzentrationsstufen zu einer gesteigerten Freisetzung von ALT und AST ins Medium führte (Abb. 11 B), resultierte die Inkubation mit VPA bei Konzentrationen von 2 mM oder höher in einem moderaten Anstieg der Leberenzymaktivitäten im Überstand (Abb. 11 A). Zusammengefaßt konnte bei den relevanten Konzentrationen, die mit einer ausgeprägten Apoptoseinduktion in Hepatomzellen einhergehen, keine relevante Toxizität auf PHH nachgewiesen werden.

3.5 Expressionsmodulation von Proteinen der Zellzyklus-Regulation und Apoptose-Signaltransduktion

Um die zugrundeliegenden Mechanismen einer HDAC-I vermittelten Tumorzellreaktion genauer zu klassifizieren, wurden Veränderungen im Expressionsmuster von Proteinen untersucht, die zentrale Funktionen in der Zellzyklus-Regulation erfüllen und in Signaltransduktionswegen der Apoptose involviert sind. Zu diesem Zweck wurden PLC/PRF/5-Zellen 48 Stunden mit jeweils 1 mM oder 2 mM VPA sowie 0,2 µM oder 0,5 µM ITF2357 inkubiert und die im Anschluss gewonnenen Zellextrakte durch Western Blotting untersucht. Die Inkubation mit 1 µM TSA diente als Positivkontrolle.

Als erstes wurden Veränderungen im Proteingehalt des Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitors p21^{cip/waf} untersucht, welcher wichtige Funktionen in der Zellzyklusregulation ausübt. Wie aus Abb. 12 A hervorgeht, verursachte die Kultivierung der Zellen mit 1 µM TSA eine deutlich sichtbare Induktion von p21. Auch die Inkubation mit VPA und ITF2357 zeigte eine signifikante, konzentrationsabhängige Verstärkung des p21-Signales, so dass die p21-Hochregulation eine wichtige Rolle bei der HDAC-I vermittelten Proliferationsinhibition spielen könnte.

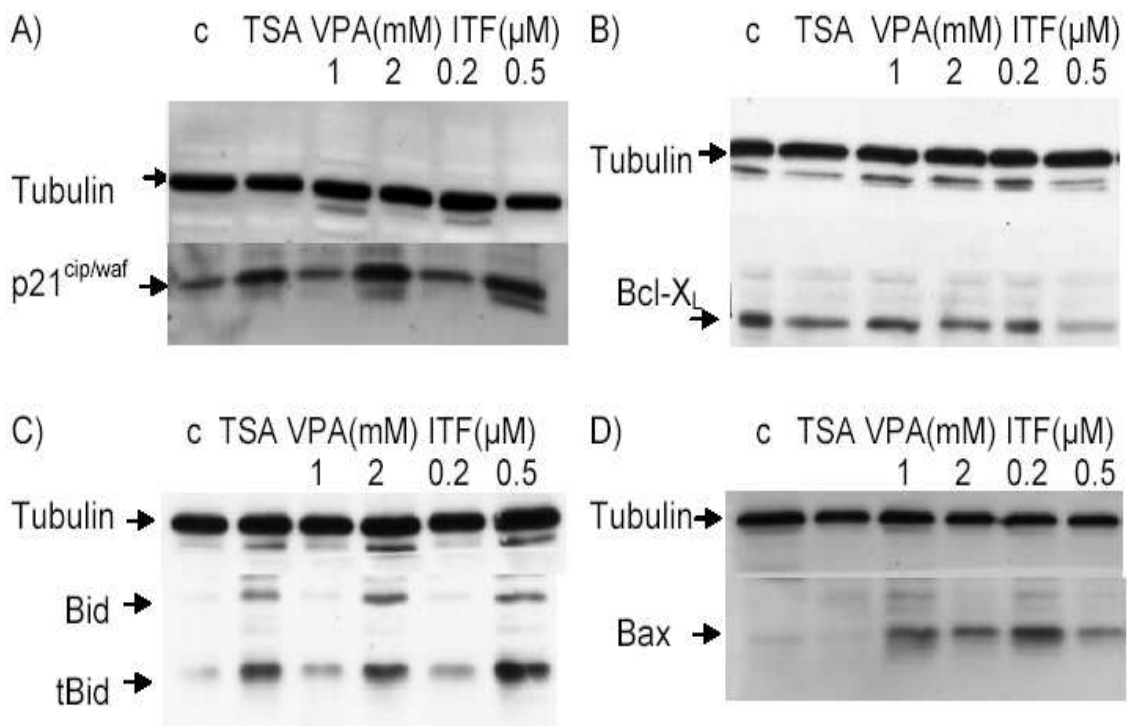


Abb. 12: Western Blot Analyse HDAC-I modulierter Proteine. Western Blot auf p21 (A), Bcl-X_L (B), Bid (C) und Bax (D) von PLC/PRF/5-Zellen nach 48 h Inkubation mit 1 μM TSA, 1 mM oder 2 mM VPA, sowie 0,2 μM oder 0,5 μM ITF2357. Nachweis gleichmäßiger Proteinbeladung durch Tubulin-Referenzbande auf demselben Blot.

Durch Charakterisierung des anti-apoptotischen Faktors Bcl-X_L, welcher eine wichtige Rolle in der Regulation der mitochondrialen Membranintegrität und damit in der intrinsischen Apoptosekaskade spielt, sollte eine weitere mögliche Modulation der Proteinexpression untersucht werden. Wie in Abb. 12 B illustriert, wies die Expression des anti-apoptotischen Proteins Bcl-X_L eine konzentrationsabhängige Reduktion als Reaktion auf alle eingesetzten HDAC-I auf (mit dem ausgeprägtesten Effekt nach Behandlung mit 0,5 μM ITF2357). Bei unbehandelten Kontrollzellen war dagegen eine deutliche Proteinexpression zu detektieren.

Weitere Untersuchungen galten dem apoptoseinduzierenden Protein Bid, dem einzigen pro-apoptotischen Mitglied der Bcl-2-Familie, welches als Bindeglied zwischen Todesrezeptor und mitochondrialer Signalkaskade fungieren kann. Es zeigte sich sowohl für Bid als auch für sein metabolisch aktives Spaltprodukt tBid eine konzentrationsabhängig verstärkte Expression (Abb. 12 C), die durch Behandlung der Zellen mit allen drei eingesetzten HDAC-I Wirkstoffen erreicht werden konnte.

Zusätzlich ergab die Untersuchung von Bax, eines weiteren pro-apoptotischen Faktors, ebenfalls einen intrazellulären Anstieg des Proteingehaltes unter VPA- und ITF2357-Inkubation (Abb. 12 D). Das etwas schwächere Signal, welches nach Exposition gegenüber 0,5 μM ITF2357 detektiert wurde, könnte durch die ausgeprägt hohe Apoptoserate in diesen Proben begründet sein.

Zusammenfassend konnte in diesen Untersuchungen eine Abnahme anti- und eine Zunahme pro-apoptotischer zellulärer Proteine nachgewiesen werden.

3.6 Hemmung der VPA- und ITF2357-vermittelten Apoptose durch Bcl-X_L-Überexpression

Um die Auswirkungen einer Bcl-X_L-Überexpression auf die Apoptoseinduktion durch HDAC-I zu untersuchen, wurden HepG2-Zellen 6 h nach Aussaat entweder mit dem Bcl-X_L kodierenden Plasmid psFFV oder einem Kontrollvektor pNeo transfiziert. Um die Transfektionseffizienz zu erfassen, wurde gleichzeitig eine Kotransfektion mit dem für GFP kodierenden Vektor pEGFP-N1 durchgeführt. 4 h nach Transfektion wurden die Zellen für weitere 48 h mit 2 mM VPA oder 0,5 μM ITF2357 inkubiert. Nach anschließender Färbung mit Annexin V-PE konnte durchflusszytometrisch die Rate an apoptotischen Zellen quantifiziert werden.

Durch Western Blotting (Abb. 13 B) wurde sichergestellt, dass die mit psFFV transfizierten Zellen eine Überexpression von Bcl-X_L aufwiesen, während mit dem Kontrollvektor pNeo transfizierte Zellen erwartungsgemäß eine Abnahme der Bcl-

X_L-Expression als Reaktion auf eine VPA- oder ITF2357-Behandlung demonstrierten.

Abb. 13 A illustriert die Ergebnisse der FACS-Analyse in transfizierten (GFP-positiven), Bcl-X_L-überexprimierenden HepG2-Zellen (weiße Balken) nach 48 h Inkubation mit 2 mM VPA oder 0,5 µM ITF2357. Die GFP-positiven Zellen, die den pNeo-Kontrollvektor (schwarze Balken) trugen, dienten zum Vergleich der Zelltodraten. Während VPA eine Apoptoserate von 32% in pNeo-transfizierten HepG2-Zellen induzierte, betrug die sub2n-DNA-Population in psFFV-Zellen ähnlich wie in den unbehandelten Kontrollzellen lediglich 16%. Dieser inhibierende Effekt konnte analog auch in ITF2357-exponierten Zellen nachgewiesen werden. Der prozentuale Anteil an apoptotischen Zellen wurde substantiell von 50% in nativen HepG2-Zellen auf 19% in Bcl-X_L-überexprimierenden Zellen reduziert.

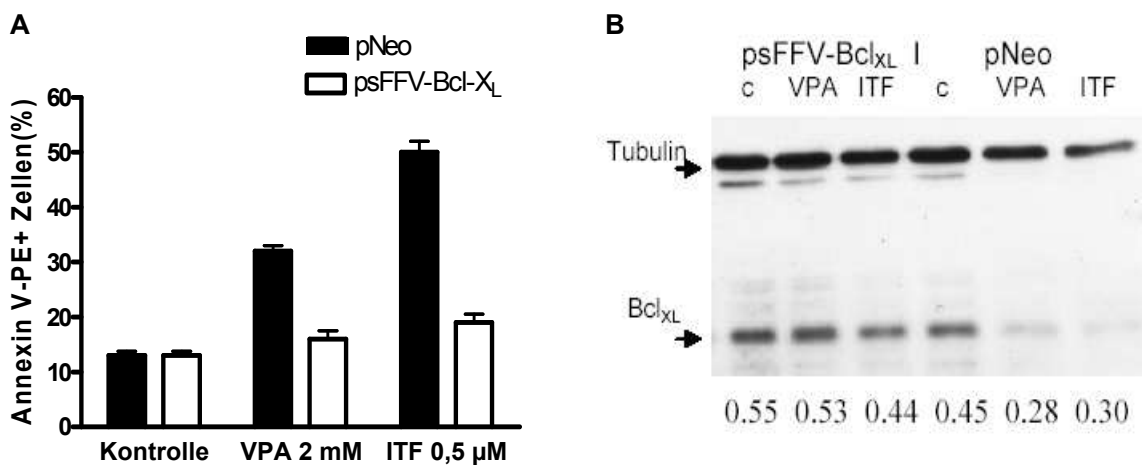


Abb. 13: Hemmung des HDAC-I induzierten apoptotischen Zelltodes durch Transfektion von Bcl-X_L. (A): Durchflusszytometrische Bestimmung der Apoptoserate in HepG2-Zellen nach Überexpression von Bcl-X_L und anschließender Behandlung mit 2 mM VPA und 0,5 µM ITF2357 für 48 h. Quantifizierung der apoptotischen Zellen durch Annexin V-Färbung. (B): Westernblot auf Bcl-X_L in HepG2 Zellen nach 48 h Inkubation mit 2 mM VPA und 0,5 µM ITF2357. Ergebnisse der densitometrischen Analyse des Verhältnisses zwischen der Tubulin-Referenzbande und der detektierten Bcl-X_L-Bande wurden unterhalb der Blots dargestellt.

Zusammenfassend konnte durch die experimentelle Strategie einer artefiziellen, intrazellulären Bcl-X_L-Überexpression herausgearbeitet werden, welche zentrale Rolle der Herunterregulation dieses anti-apoptotischen Faktors bei der HDAC-I induzierten Apoptose zukommt.

3.7 Sensibilisierung humaner Hepatomzellen gegenüber TRAIL durch VPA und ITF2357

Das Zytokin TRAIL (*Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand*) ist eine der viel versprechendsten Substanzen in der klinischen Onkologie mit einer selektiven Anti-Tumorwirkung. Allerdings gelten Hepatome im Gegensatz zu vielen anderen Tumorentitäten nach bisherigem Kenntnisstand als weitgehend TRAIL-resistent. Nachdem der modulatorische Effekt von VPA und ITF2357 auf die Proteinexpression untersucht wurde, stellte sich die Frage, inwieweit diese epigenetische „Umprogrammierung“ in der Lage ist, die den Hepatomzellen eigene TRAIL-Resistenz zu überwinden und die Zellen gegenüber diesem Todesliganden zu sensibilisieren.

Zu diesem Zweck wurden HepG2-Zellen in verschiedenen Inkubationsmodi mit HDAC-I und TRAIL kultiviert (Abb. 14 A): Die Zellen wurden mit 1 µM TSA, 1 mM oder 2 mM VPA, sowie mit 0,2 µM oder 0,5 µM ITF2357 24 h oder 48 h, mit oder ohne Zugabe von 100 ng/ml TRAIL inkubiert und bezüglich ihrer Apoptoserate quantifiziert. Die TRAIL-Inkubation erfolgte in den 24 h Proben parallel zu einer HDAC-I-Inkubation, in den 48 h Proben nur während den letzten 24 h Inkubationszeit. Die FACS-Analyse zeigte erwartungsgemäß eine äußerst schwache Apoptoserate in Zellen, welche nur mit 100 ng/ml TRAIL kultiviert worden waren (TRAIL Resistenz) und eine moderate, konzentrationsabhängige Zelltodrate durch VPA und ITF2357 alleine.

Wie in Abb. 14 A illustriert, konnte jedoch in HepG2-Zellen, bei denen eine 24-stündige VPA- oder ITF2357-Exposition vorausgegangen war, die Empfindlichkeit

gegenüber TRAIL-vermittelter Apoptose so deutlich gesteigert werden, dass TRAIL nach insgesamt 48-stündiger Inkubation die sub2n-DNA-Population in diesen Kulturen auf 75-90% potenzierte, während eine 24-stündige Koinkubation mit HDAC-I und TRAIL nur deutlich niedrigere Zelltodraten erreichte. TSA führte ebenfalls zu einer erhöhten Rate apoptotischer Zellen; potenzierende Effekte durch TRAIL konnten bei dieser bereits initial hohen Apoptoserate jedoch nicht erfasst werden.

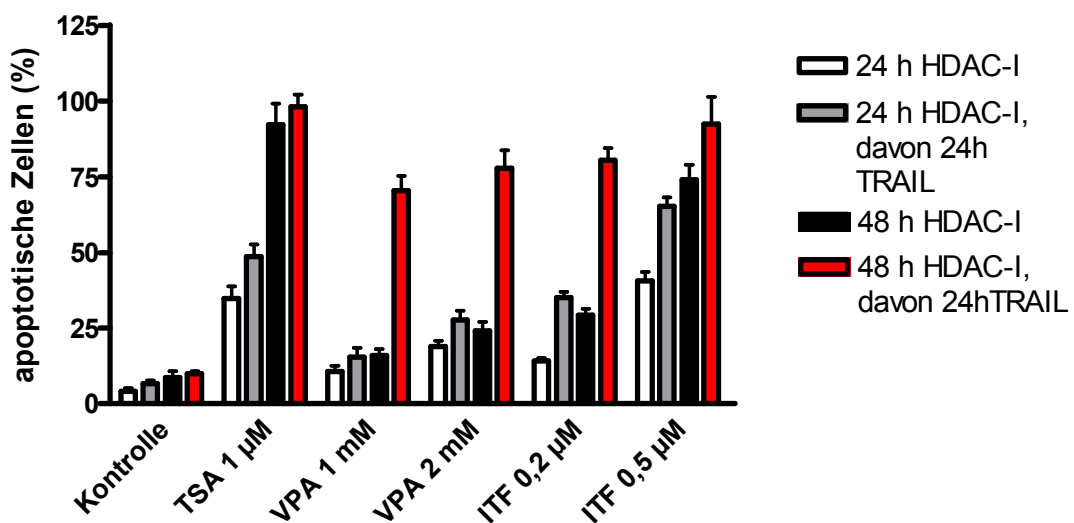


Abb. 14: HDAC-I induzierte TRAIL-Sensibilisierung bei HepG2-Zellen. Durchflusszytometrische Bestimmung der Apoptoserate in HepG2-Zellen nach 24 h oder 48 h Inkubation mit 1 µM TSA, 1 mM oder 2 mM VPA, sowie 0,2 µM oder 0,5 µM ITF2357, mit oder ohne Zugabe von TRAIL (100 ng/ml) in den letzten 24 h. Quantifizierung der Apoptose durch Bestimmung der Zellfraktion mit sub2n-DNA. Dargestellt sind Mittelwerte aus 2 unabhängigen Versuchen und die einfache SD.

Um die TRAIL-Sensibilisierung durch HDAC-I auch für weitere HCC-Zelllinien nachzuweisen, wurden HuH-7- und PLC/PRF/5-Zellen ebenfalls für 48 h mit 1 µM TSA, 1 mM oder 2 mM VPA, sowie 0,2 µM oder 0,5 µM ITF2357, jeweils mit oder ohne Zugabe von 100 ng/ml TRAIL kultiviert (Abb. 15).

Die FACS-Analyse zeigte, dass VPA und ITF2357 auch die Empfindlichkeit dieser Hepatomzellen gegenüber dem Todesliganden erheblich steigern konnte, wobei sich PLC/PRF/5-Zellen bis auf die Vorbehandlung mit 2 mM VPA durchweg

schlechter gegenüber TRAIL sensibilisieren ließen als HepG2- oder HuH-7-Zellen. Zusammenfassend konnte TRAIL, in Abhängigkeit von der jeweils untersuchten Zelllinie und der jeweils eingesetzten HDAC-I Konzentration, die Apoptoseraten in VPA- und ITF2357-vorinkubierten Zellen potenzieren, ohne dass bei einem Einsatz als Monotherapie in relevantem Maße Zelltod induziert werden konnte.

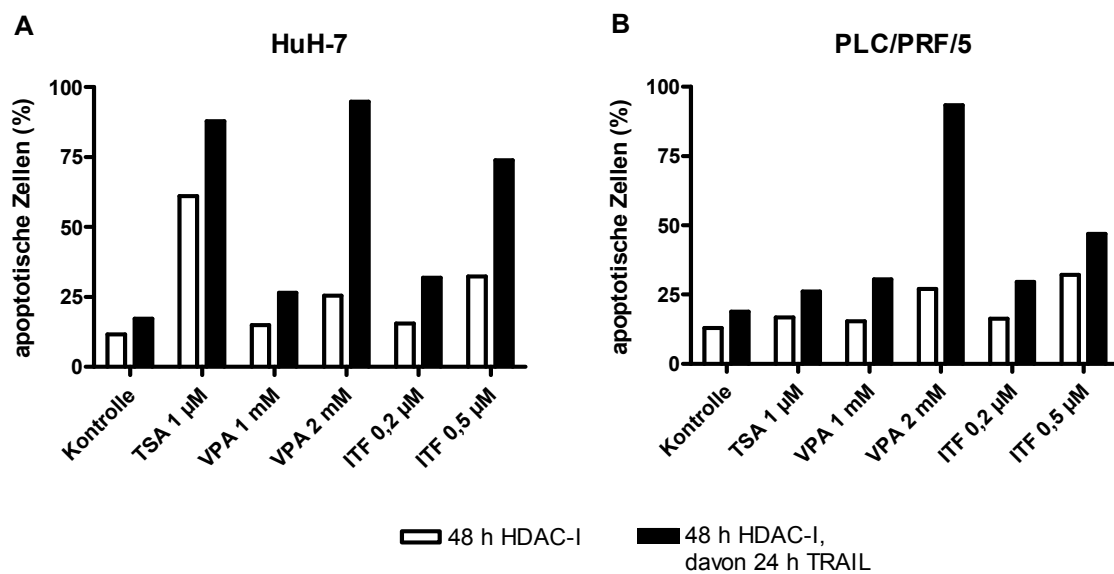


Abb. 15: HDAC-I induzierte TRAIL-Sensibilisierung humaner Hepatomzellen. Durchflusszytometrische Bestimmung der Apoptoserate in HuH-7-Zellen (A) und PLC/PRF/5-Zellen (B) nach 48 h Inkubation mit 1 µM TSA, 1 mM oder mM VPA, sowie 0,2 µM oder 0,5 µM ITF2357, mit oder ohne Zugabe von TRAIL 100 ng/ml in den letzten 24 h der Inkubationszeit. Quantifizierung der Apoptose durch Bestimmung der Zellfraktion mit sub2n-DNA Gehalt.

Da für eine maximale Apoptoserate sowohl eine ausreichend lange Vorinkubationsperiode mit HDAC-I als auch ein optimaler TRAIL-Zugabezeitpunkt essentiell erschien, wurden weitere Experimente durchgeführt, um diese beiden Parameter näher zu untersuchen. Um die Zeit der Vorinkubation zu variieren, wurden HepG2-Zellen nach jeweils 36-, 48- und 72-stündiger Inkubation mit 1 µM TSA, 1 mM oder 2 mM VPA, 0,2 µM oder 0,5 µM ITF2357 für weitere 24 h mit 100 ng/ml TRAIL kultiviert (Abb. 16 A).

In einem zweiten Ansatz wurden die Zellen mit den gleichen Konzentrationen der HDAC-I Wirkstoffe für 48 h inkubiert, wobei die Zugabe von 100 ng/ml TRAIL nach 24 h, 30 h oder 42 h erfolgte (Abb. 16 B). Anschließend wurden die Zellen mit Propidiumjodid gefärbt und die sub2n-DNA-Population quantifiziert. Die Ergebnisse beider Experimente zeigten, dass optimale Zelltodraten erreicht wurden, wenn die Zellen 48 h mit den verschiedenen HDAC-I kultiviert worden waren und die TRAIL-Zugabe nach den ersten 24 h der HDAC-I Inkubationszeit erfolgte.

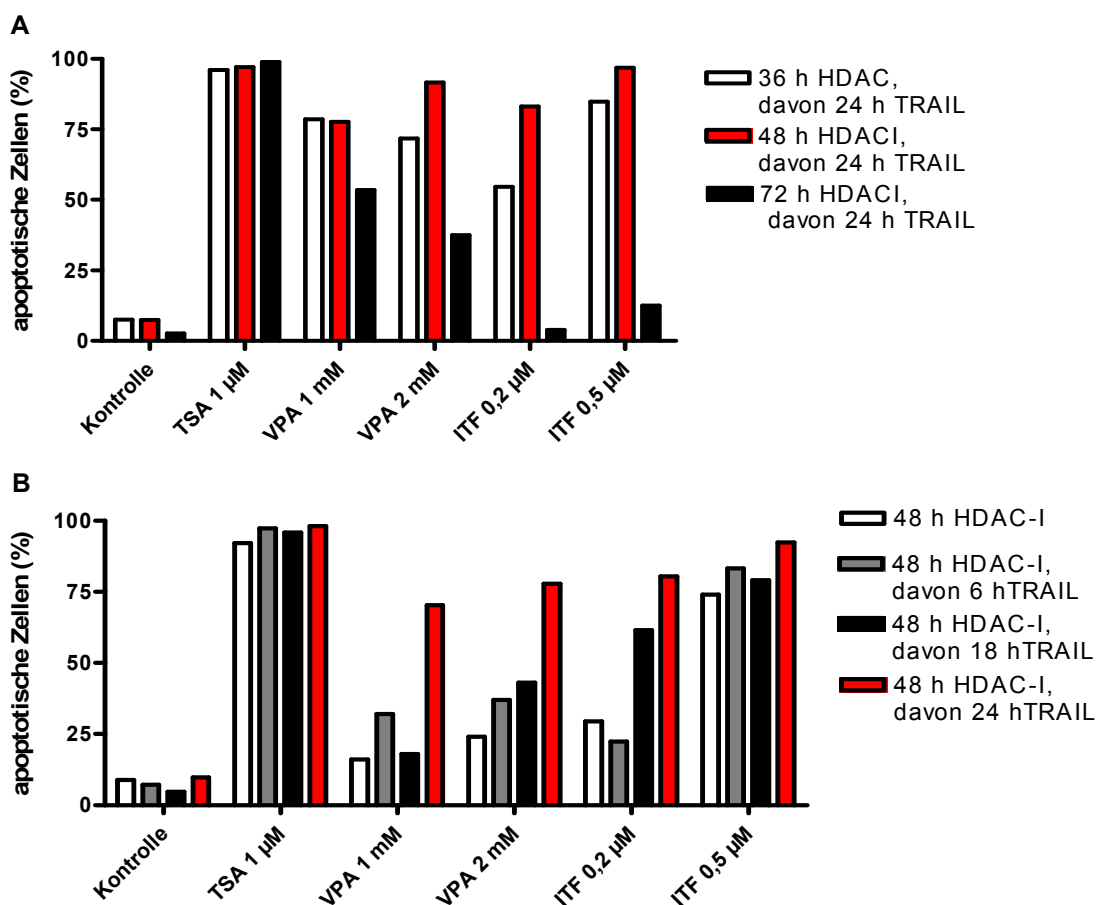


Abb. 16: Zelltodrate nach Kombinationstherapie in Abhängigkeit der HDAC-I Vorinkubation. Durchflusszytometrische Bestimmung der Apoptoserate in HepG2-Zellen bei Variation der HDAC-I-Vorinkubationszeit und konstanter Inkubation mit TRAIL 100 ng / ml während der letzten 24 h der Inkubationszeit (A), sowie bei Variation des Zugabezeitpunktes von TRAIL 100 ng/ml und konstanter 48 h Inkubation mit 1 μ M TSA, 1 mM VPA, 2 mM VPA, 0,2 μ M ITF2357 oder 0,5 μ M ITF2357 (B). Quantifizierung der Apoptose durch Bestimmung der Zellfraktion mit sub2n-DNA Gehalt.

3.8 Die Rolle des Histonacetylierungsstatus bei der TRAIL-Sensibilisierung von Hepatomzellen

Um die Bedeutung einer suffizienten, die gesamte Inkubationsperiode überdauernden HDAC-Inhibition für die TRAIL-Sensibilisierung von HCC-Zellen zu klären, wurde folgender Versuchsaufbau gewählt: HepG2-Zellen wurden 48 h mit 1 μ M TSA, 1 mM oder 2 mM VPA, 0,2 μ M oder 0,5 μ M ITF2357 kultiviert, jeweils mit oder ohne Zugabe von 100 ng/ml TRAIL in den letzten 24 h (Abb. 17 A, weiße bzw. rote Balken). In einem dritten Ansatz wurden die Zellen 24 h mit oben genannten HDAC-I Wirkstoffen inkubiert, anschließend erfolgte eine Entfernung der Substanzen durch Mediumwechsel und eine weitere 24-stündige Kultur in frischem, HDAC-I freiem Medium unter Zusatz von 100 ng/ml TRAIL (Abb. 17 A, schwarze Balken).

Die Ergebnisse der FACS-Analyse in Abb. 17 A verdeutlichen, dass die TRAIL-Sensibilisierung in den Zellen insuffizient gewesen ist, deren Medium in der zweiten Hälfte der Inkubationsperiode zum Zeitpunkt der TRAIL-Zugabe keine HDAC-I mehr enthielt (schwarze Balken), so dass diese Zellen verglichen zu denen mit konstanter, 48-stündiger HDAC-Inhibition (rote Balken) deutlich schwächere Apoptoseraten aufwiesen. Der prozentuale Anteil apoptotischer Zellen wurde bei VPA und ITF2357 durch die 24-stündige HDAC-I Karenz um 27% (0,5 μ M ITF2357) bis 72% (2 mM VPA) gesenkt. Die Inkubation mit 1 μ M TSA ergab bereits bei alleiniger HDAC-I Inkubation eine ausgeprägte Induktion von Apoptose, so dass durch TRAIL-Zugabe keine Erhöhung der apoptotischen Zellfraktion mehr erreicht werden konnte.

Die Notwendigkeit einer durchgehenden HDAC-Inhibition zur Überwindung der TRAIL-Resistenz könnte, wie in Abb. 17 B illustriert, in der Reversibilität der Histonhyperacetylierung mit begründet zu sein. Während bei HepG2-Zellen, welche durchgängig 24 h oder 48 h mit 1 mM VPA oder 0,2 μ M ITF2357 kultiviert worden waren, eine verglichen zur Kontrolle deutlich stärkere Ach3 Bande

(acetyliertes Histon H3) im Western Blot sichtbar war (Abb. 17 B; Spuren 6 und 8), zeigte sich in Kulturen nach 24 h HDAC-I Exposition und 24 h HDAC-I Karenz ein Rückgang der Ach3 Expression auf das Niveau unbehandelter Zellen (Abb. 17 B; Spuren 5 und 7). Zusammenfassend zeigen diese Untersuchungen, dass aufgrund der Reversibilität der Histonhyperacetylierung eine dauernde HDAC-Inhibition während der gesamten Inkubationsperiode als unbedingte Voraussetzung anzusehen ist, wenn eine maximale Apoptoseinduktion durch TRAIL in den Hepatomzellen erzielt werden soll.

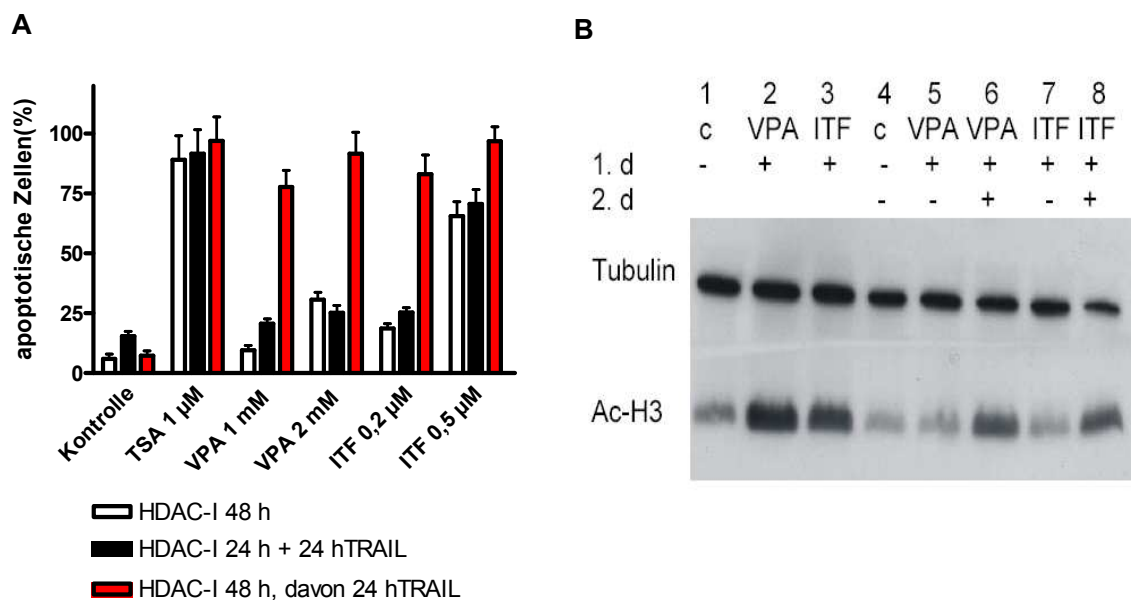


Abb. 17: Notwendigkeit einer kontinuierlichen HDAC-I Inkubation für eine TRAIL-Sensibilisierung von Hepatomzellen. (A): HepG2-Zellen wurden unter 3 unterschiedlichen Bedingungen kultiviert: 48 h HDAC-I mit oder ohne TRAIL (100 ng/ml) in den letzten 24 h sowie 24 h HDAC-I und anschließend 24 h TRAIL. Quantifizierung der Apoptose durch FACS-Analyse und Bestimmung der Zellen mit sub2n-DNA Gehalt. Dargestellt sind Mittelwerte aus 2 unabhängigen Versuchen und die einfache SD. (B): Western Blot auf Ach3 Expression in HepG2-Zellen nach folgenden Behandlungen: 1 = unbehandelte Kontrolle 24 h; 2 = 24 h 1 mM VPA; 3 = 24 h 0,2 µM ITF2357; 4 = unbehandelte Kontrolle 48 h; 5 = 24 h 1 mM VPA + 24 h Medium; 6 = 48 h 1 mM VPA; 7 = 24 h 0,2 µM ITF2357 + 24 h Medium; 8 = 48 h 0,2 µM ITF2357. Nachweis gleichmäßiger Proteinbeladung durch Tubulinbande auf demselben Blot.

3.9 TRAIL-Rezeptorstatus in HepG2-Zellen nach HDAC-Inhibition

Eine HDAC-I vermittelte Hochregulation pro-apoptotischer TRAIL-Rezeptoren könnte eine mögliche Erklärung für die gesteigerte Sensitivität der Hepatomzellen gegenüber dem Todesliganden TRAIL sein. Um diese Hypothese zu prüfen, wurden die Präsentation der Rezeptoren TRAIL-R1 und -R2 auf der Zelloberfläche von Hepatomzellen sowie deren Expression auf mRNA-Ebene untersucht.

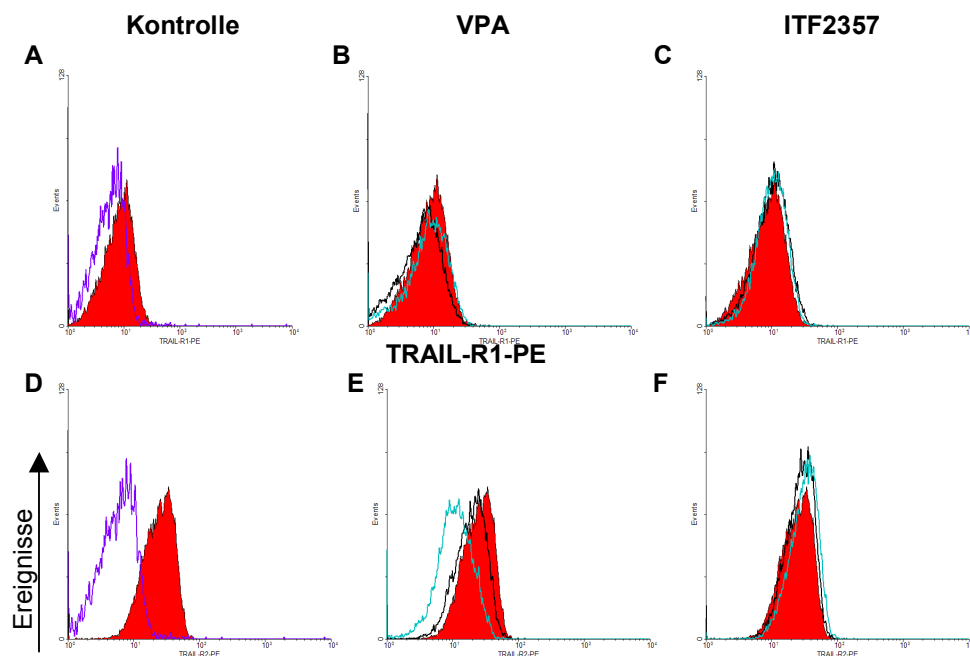


Abb. 18: HDAC-I Inkubation induziert keine erhöhte Präsentation pro-apoptotischer TRAIL-Rezeptoren an der Zelloberfläche von Hepatomzellen. FACS-Analyse von TRAIL-R1 und -R2 auf HepG2-Zellen nach Behandlung mit 1 mM oder 2 mM VPA (B und E), sowie mit 0,2 µM oder 0,5 µM ITF2357 (C und F). Markierung der Zellen mit biotinylierten Antikörpern gegen TRAIL-R1 und -R2 und Streptavidin-PE. Lila Linie: Isotypen-Kontrolle. Türkise Linie: die jeweils geringere Konzentration der HDAC-I (1 mM VPA, 0,2 µM ITF2357). Schwarze Linie: die höhere Konzentration der HDAC-I (2 mM VPA, 0,5 µM ITF2357).

HepG2-Zellen wurden 48 h mit 1 mM und 2 mM VPA, sowie 0,2 µM und 0,5 µM ITF2357 kultiviert, anschließend mit Antikörpern gegen TRAIL-R1 und -R2 markiert

und durchflusszytometrisch untersucht. Die in Abb. 18 dargestellten Histogramme der unbehandelten Kontrollkulturen zeigten die basale Expression von TRAIL-R1 und -R2 von HepG2-Zellen (A, D; rotes Histogramm). Die Behandlung mit 1 mM VPA (türkise Linie) und 2 mM VPA (schwarze Linie) (B, E) reduzierte in konzentrationsabhängiger Weise die Expression der Rezeptoren TRAIL-R1 und -R2, während die Inkubation mit 0,2 μ M (türkise Linie) und 0,5 μ M ITF2357 (schwarze Linie) (C, F) keine Veränderung der Rezeptor-Expression zur Folge hatte, so dass eine veränderte Rezeptorpräsentation an der Zelloberfläche als Ursache für die erhöhte Empfindlichkeit der Hepatomzellen gegenüber TRAIL nicht in Frage kommt.

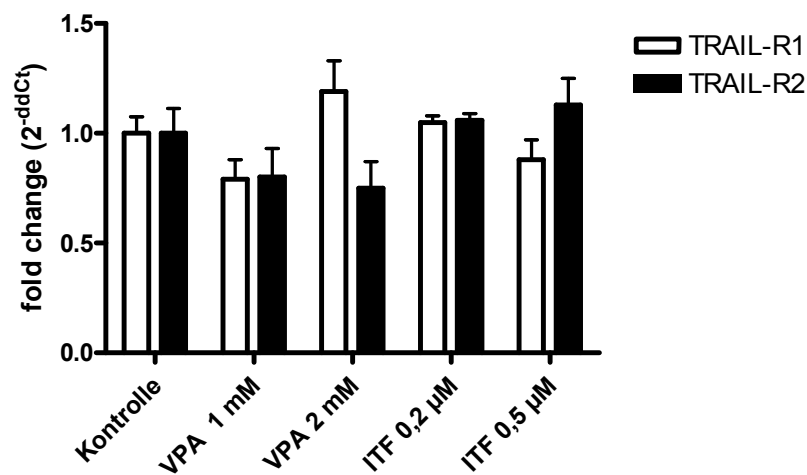


Abb. 19: Expressionsanalyse von TRAIL-R1 und -R2 in HepG2-Zellen. HepG2-Zellen wurden nach 48 h Inkubation mit 1 mM oder 2 mM VPA sowie 0,2 μ M oder 0,5 μ M ITF2357 untersucht. Die Menge an spezifischer TRAIL-R1 und -R2 mRNA wurde mittels reverser Transkription und TaqMan-PCR untersucht. Die Expression wurde auf GAPDH normiert und die rel. Veränderung (2^{-ddCt}) relativ zu unbehandelten Kulturen berechnet.

Um dieses Ergebnis auch auf Transkriptionsebene zu validieren, wurde nach 48-stündiger Kultur mit VPA und ITF2357 die Gesamt-RNA der HepG2-Zellen isoliert und die mRNA-Expression von TRAIL-R1 und -R2 in den Zellen mittels quantitativer RT-PCR untersucht (Abb. 19). Es zeigte sich, analog zur FACS-

Analyse, keine signifikante Veränderung des Gehalts an TRAIL-R1- und -R2-mRNA-Transkripten, so dass auch auf dieser Ebene keine Hochregulation proapoptischer TRAIL Rezeptoren durch HDAC-I nachgewiesen werden konnte.

3.10 Modulation der FLIP-Expression in Hepatomzellen und PHH durch VPA und ITF2357

Nach Untersuchung der pro-apoptischen TRAIL-Rezeptoren wurde als nächster Schritt auf der Suche nach Faktoren, die eine HDAC-I vermittelte Sensibilisierung von Hepatomzellen gegenüber TRAIL begründen könnten, die Expression des "Flice-inhibitory protein" FLIP analysiert. Dieser anti-apoptische Faktor verhindert in der Apoptose-Signalkaskade die Aktivierung von Caspase 8 und erfüllt damit die Funktion eines Inhibitors der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose.

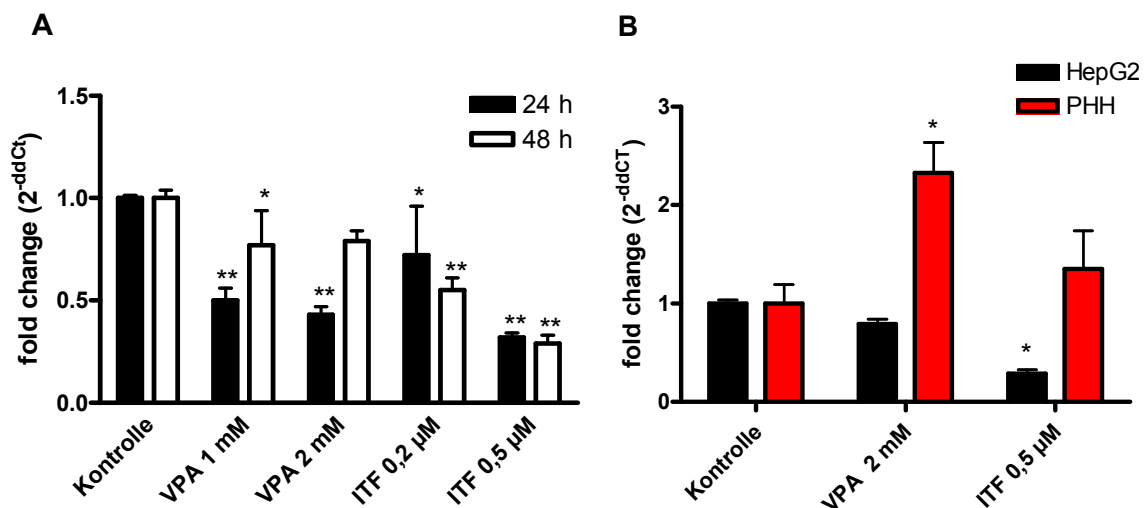


Abb. 20: HDAC-I induzierte Regulation von FLIP in humanen Hepatomzellen. Expressionsanalyse von FLIP in (A) HepG2-Zellen nach 24 h oder 48 h Inkubation mit 2 mM VPA oder 0,2 µM ITF2357 sowie (B) HepG2-Zellen und PHH nach 48 h Inkubation mit 2 mM VPA oder 0,2 µM ITF2357. Die Menge an spezifischer FLIP-mRNA wurde mittels reverser Transkription und TaqMan-PCR untersucht. Die Expression wurde auf GAPDH normiert und die relative Veränderung ($2^{-\Delta\Delta Ct}$) relativ zu unbehandelten Kulturen dargestellt. Die statistische Auswertung der Versuche erfolgte mit dem Dunnett's PostTest (One-way ANOVA, * $p < 0,05$, ** $p > 0,001$).

Um zu untersuchen, ob die FLIP-Expression in Hepatomzellen durch HDAC-I auf transkriptioneller Ebene eine Modulation erfährt, wurden HepG2-Zellen für 24 h oder 48 h mit 1 mM oder 2 mM VPA, sowie 0,2 μ M oder 0,5 μ M ITF2357 kultiviert und nach Isolation der Gesamt-RNA einer quantitativen RT-PCR zur Analyse der FLIP-mRNA-Expression zugeführt. Die in Abb. 20 A dargestellten Ergebnisse der Expressionsanalyse zeigen eine signifikante, konzentrationsabhängige Reduktion der FLIP-mRNA-Transkripte in HepG2-Zellen als Reaktion auf beide HDAC-I Wirkstoffe. VPA-behandelte Kulturen boten bereits nach 24 h eine Abnahme der mRNA-Expression auf 43% ($p < 0,001$) verglichen zu unbehandelten Kontrollzellen, während ITF2357-behandelte Zellen ihre maximale Reduktion auf 29% ($p < 0,001$) nach 48 h erreichten. Die verringerte FLIP-Expression in HDAC-I beladenen Zellen könnte somit eine substantielle Rolle für die Wiederherstellung der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose von Hepatomzellen spielen.

Nachdem in den vorangegangenen Versuchen bereits gezeigt werden konnte, dass HDAC-I selektiv in HCC-Zellen, aber nicht in primären humanen Hepatozyten (PHH) Apoptose auslösen, stellte sich die Frage, wie die FLIP-Regulation in dieser Zellpopulation aussieht. Daher wurde als nächster Schritt die FLIP-Regulation in PHH nach HDAC-Inhibition untersucht. Nach 48-stündiger Kultur mit 2 mM VPA oder 0,5 μ M ITF2357 wurden PHH gemeinsam mit identisch behandelten HepG2-Zellen einer FLIP-Expressionsanalyse unterzogen. Im Gegensatz zu humanen Hepatomzellen konnte, wie in Abb. 20 B illustriert, mittels quantitativer RT-PCR in den PHH ein signifikanter Anstieg der FLIP-mRNA-Transkripte nach VPA- und ITF2357-Exposition erfasst werden ($p < 0,05$), während HepG2-Zellen nach HDAC-Inhibition erwartungsgemäß eine Reduktion ihres FLIP-mRNA-Gehalt präsentierten.

Um zu klären, ob ähnliche Effekte ebenfalls auf Proteinebene zu detektieren sind, wurden nachfolgend zelluläre Extrakte von HepG2-, HuH-7-Zellen und PHH nach einer 48-stündigen Inkubation mit 1 mM oder 2 mM VPA sowie 0,2 μ M oder 0,5 μ M ITF2357 durch Western Blotting untersucht. Wie in Abb. 21 A und B illustriert, konnte aus den Lysaten beider Hepatomzelllinien eine Abnahme der FLIP-

Expression als Reaktion auf beide eingesetzten HDAC-I Wirkstoffe nachgewiesen werden. Die densitometrische Analyse ergab eine Reduktion des FLIP-Signals in HepG2-Zellen von 100% in der unbehandelten Kontrollkultur bis auf 29% durch VPA- und auf 33% durch ITF2357-Exposition; HuH-7-Zellen boten ebenfalls einen deutlichen Rückgang des FLIP-Proteingehalts bis auf 54% durch Inkubation mit VPA und auf 64% durch ITF2357.

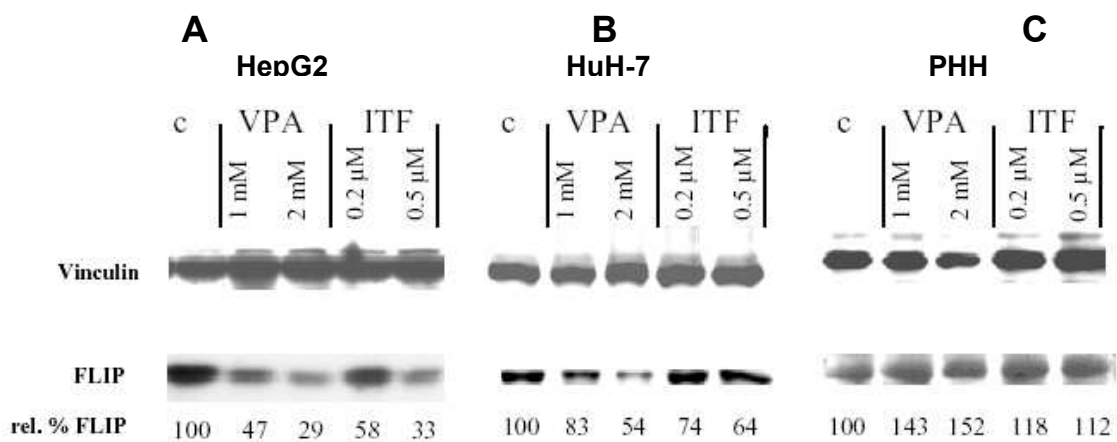


Abb. 21: Differentielle Regulation von FLIP in humanen Hepatomzellen und PHH. Western Blot Analyse auf FLIP in HepG2- (A), HuH-7-Zellen (B) und PHH (C) nach 48 h Inkubation mit 1 mM oder 2 mM VPA sowie 0,2 μM oder 0,5 μM ITF2357. Angabe der relativen FLIP-Menge durch densitometrische Analyse des Verhältnisses zwischen der Vinculin-Referenzbande und der detektierten FLIP-Bande.

Im Gegensatz zu den Hepatomzellen zeigte sich bei den PHH analog zu den Ergebnissen der RT-PCR nach VPA- und ITF2357-Behandlung eine Zunahme des zellulären FLIP-Proteins, am deutlichsten bis auf 152% in der Densitometrie-Auswertung nach 2 mM VPA verglichen zur unbehandelten Kontrollkultur (Abb. 21 C). Zusammengefasst zeigen diese Ergebnisse eine durch die HDAC-I Substanzen VPA und ITF2357 in Tumorzellen und normalen Zellen bewirkte differentielle FLIP-Expression.

3.11 Toxizitätsanalyse der HDAC-I/TRAIL-Kombinationstherapie auf PHH

Obwohl sich die HDAC-I VPA und ITF2357 in den vorhergehenden Analysen als ausgesprochen verträglich für gesunde Hepatozyten erwiesen hatten, mussten für die Kombinationsbehandlung von HDAC-I und TRAIL erneute Toxizitätsuntersuchungen an PHH durchgeführt werden, da bestimmte Präparationen von löslichem TRAIL bekanntermaßen zu einem massiven Zellzerfall in gesundem Lebergewebe führen können und daher jede potentielle Anwendung von TRAIL in Bezug auf Hepatotoxizität untersucht werden sollte.

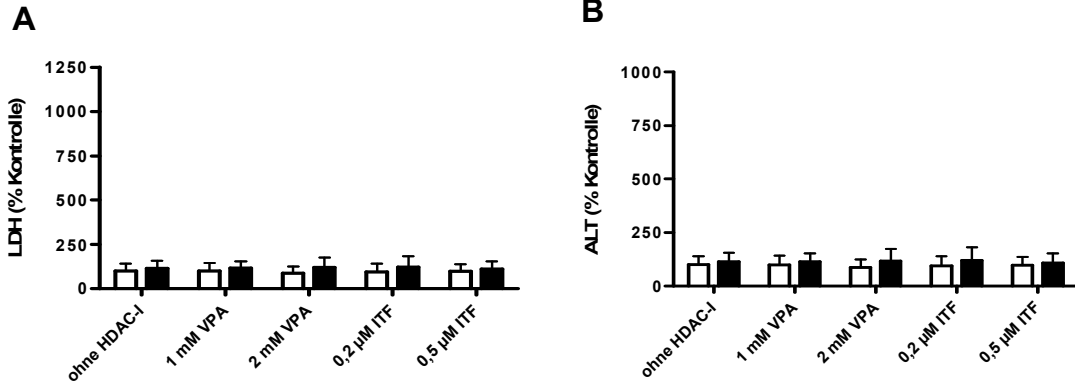
Da die zellulären Reaktionsmuster von PHH unterschiedlicher Spender mitunter stark variieren können, wurden humane Hepatozyten von fünf verschiedenen Individuen in vier voneinander unabhängigen Versuchen mit den relevanten Konzentrationen 1 mM oder 2 mM VPA, sowie 0,2 µM oder 0,5 µM ITF2357 für 48 h inkubiert, mit oder ohne Zugabe von 100 ng/ml TRAIL in den letzten 24 h.

Als Screening-Methode auf Hepatotoxizität durch die angewendeten Substanzen, erfolgte die Quantifizierung der ALT- und LDH-Freisetzung in das Kulturmedium (Abb. 22 A und B). Analog behandelte HepG2-Zellen wurden ebenfalls in das Experiment mit eingeschlossen und zum Vergleich bezüglich ihrer ALT- und LDH-Freisetzung analysiert (Abb. 22C und D).

Während HepG2-Hepatomzellen z.B. nach Exposition gegenüber 2 mM VPA + 100 ng/ml TRAIL mit einer deutlichen Apoptoseinduktion reagierten, welche mit einer Erhöhung der LDH-Freisetzung ins Medium bis zum 10-fachen und einer Erhöhung der ALT-Freisetzung bis zum 7-fachen verglichen zur unbehandelten Kontrollkultur einherging (Abb. 22 C), zeigten nicht-transformierte Hepatozyten (PHH) bei allen Kombinationsbehandlungen von HDAC-I und TRAIL keine messbaren LDH- und ALT-Aktivitätserhöhungen (Abb. 22A und B).

Zusammenfassend zeigen sowohl HDAC-I Wirkstoffe allein als auch in Kombination mit TRAIL ein viel versprechendes Toxizitätsprofil, das zukünftige therapeutische Anwendungen von VPA bzw. ITF2357 alleine oder in Kombination mit TRAIL *in vivo* ermöglichen sollte.

PHH



HepG2

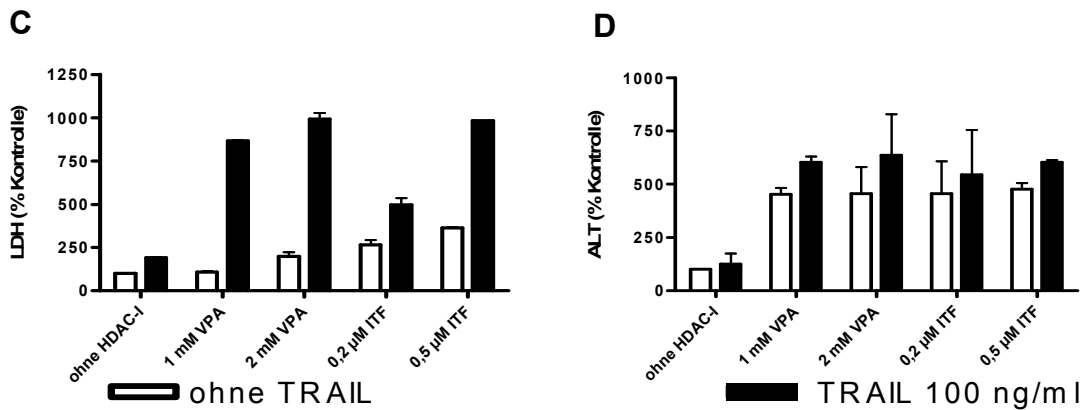


Abb. 22: Primäre humane Hepatozyten (PHH) tolerieren eine HDAC-I/TRAIL-Kombinationsbehandlung in hervorragender Weise. Bestimmung der LDH- (A) und ALT-Aktivität (B) im Überstand von PHH fünf verschiedener Spender nach 48 h Inkubation der Zellen mit 1 mM oder 2 mM VPA, sowie 0,2 µM oder 0,5 µM ITF2357. Die Zugabe von TRAIL erfolgte in der Konzentration von 100 ng/ml (schwarze Balken). Dargestellt sind Mittelwerte aus 4 unabhängigen Versuchen und die einfache SD. Statistische Auswertung der Versuche mit dem Dunett's PostTest (One-way ANOVA).

4 Diskussion

Die Resistenz maligner Hepatomzellen gegenüber konventionellen zytotoxischen Agenzien stellt ein schon lange bekanntes Problem in der Therapie des fortgeschrittenen Hepatozellulären Karzinoms (HCC) dar. Als unmittelbare Folge hieraus ergibt sich, dass es bisher kein etabliertes Chemotherapieregime zur Behandlung des HCC mit einem zufriedenstellenden Verhältnis von Wirksamkeit und Nebenwirkungsprofil gibt. Da somit in nicht resektablen Krankheitsstadien des HCC momentan keine Standardtherapie zur Verfügung steht, erscheint es um so wichtiger, gezielt nach alternativen Therapieoptionen mit potenten neuartigen Substanzen für einen möglichen Einsatz in der zukünftigen HCC-Behandlung zu suchen.

Aktuelle Untersuchungen in unterschiedlichen Tumormodellen gaben Hinweise darauf, dass Histondeacetylase-Inhibitoren (HDAC-I) durch einen neuartigen Wirkmechanismus einen viel versprechenden, neuen Ansatz in der klinischen Onkologie darstellen könnten. Mit Hilfe dieser Substanzen kann eine Modulation des sog. epigenetischen Codes durch eine Hyperacetylierung von DNA-assoziierten Histonproteinen und damit eine therapeutisch intendierte Änderung von Genexpressionsmustern erreicht werden. Eine daraus resultierende genetische „Reprogrammierung“ maligner Zellen könnte durch die Modulation von Genen, die im Rahmen der malignen Transformation reprimiert worden sind, zu einer Reaktivierung führen, so dass Wachstumsinhibition, Zellzyklusarretierung und Apoptoseinduktion in Tumorzellen die Folge sind. Aus diesen Gründen wurden in der vorliegenden Arbeit die neuartigen HDAC-I Wirkstoffe VPA und ITF2357 bezüglich ihrer molekularen Mechanismen, ihrer Wirksamkeitsprofile und möglichen kombinatorischen Behandlung mit anderen Wirkprinzipien auf Hepatomzelllinien detailliert charakterisiert.

4.1 Hemmung der Histondeacetylase-Aktivität als wirksames therapeutisches Prinzip in humanen Hepatomzelllinien

Erste Hinweise, dass eine epigenetische Modifikation des Chromatins durch Inhibition der Histondeacetylase-Aktivität ein viel versprechender, experimenteller Therapieansatz in der Behandlung des HCC darstellen könnte, wurden durch einige Arbeiten der jüngeren Vergangenheit evident. Es konnte gezeigt werden, dass der bekannte HDAC-I TSA in den humanen Hepatomzelllinien HepG2, HuH-7 und Hep3B eine Wachstumsinhibition sowie apoptotischen Zelluntergang auslösen kann (Herold et al., 2002; Yamashita et al., 2003). Ähnliche Ergebnisse wurden auch für den HDAC-I 4-Phenylbutyrat sowohl *in vitro* in den HCC-Zelllinien Hep3B und HepT1 als auch *in vivo* in einem Nacktmausmodell berichtet (Svechnikova et al., 2003).

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass die HDAC-I Wirkstoffe VPA und ITF2357 eine deutliche antiproliferative Aktivität zeigen und dass sie potente Induktoren von Apoptose in humanen Hepatomzellen sind.

Hinsichtlich der molekulare Mechanismen, auf deren Basis Hepatomzellen spezifisch auf VPA oder ITF2357 reagieren, konnten nachfolgende Beobachtungen gemacht werden:

- i. Eine Akkumulation hyperacetylierter Histonproteine, welche zuvor für VPA (Phiel et al., 2001; Göttlicher et al., 2001) und ITF2357 (Mascagni et al., unveröffentlichte Daten) in verschiedenen Zelllinien, jedoch nicht in Hepatomzelllinien gezeigt worden war, konnte in HepG2-Zellen nachgewiesen werden.
- ii. Die HCC-Zelllinien HepG2, HuH-7 und PLC/PRF/5 zeigten eine konzentrationsabhängige Proliferationsinhibition sowie ein komplettes Absterben der Zellen nach 5-tägiger Inkubation mit VPA oder ITF2357 (SRB-Assay).

- iii. Apoptosephänomene konnten durchflusszytometrisch durch Bestimmung der Zellfraktion mit sub2n-DNA Gehalt sowie durch einen ELISA auf Aktivierung von Effektorcaspasen quantifiziert werden.

Angesichts dieser vielversprechenden *in vitro*-Daten von VPA und ITF2357 in Hinblick auf Proliferationsinhibition und Zytotoxizität in Tumorzellen, die weit über die Wirkung konventioneller Chemotherapeutika hinausgehen, legitimieren diese Ergebnisse eine weitergehende Überprüfung beider Substanzen bezüglich ihrer *in vivo*-Effektivität in Tiermodellen.

4.2 Expressionsmodulation von Proteinen der Zellzyklus-Regulation und der Apoptose-Signaltransduktion

Zur Beantwortung der Frage nach den molekularen Mechanismen, welche eine Selektivität der HDAC-I vermittelten Proliferationsinhibition und Induktion von Apoptose in Hepatomzellen begründen, werden zur Zeit immer mehr Informationen bezüglich der durch HDAC-I modulierten zellulären Expressionsmodulation zusammengetragen, welche schließlich zu einer mechanistischen Erklärung der beobachteten Phänomene beitragen können.

Von den meisten der bekannten HDAC-I Wirkstoffen (wie TSA, SAHA oder den Butyraten) wurde bisher berichtet, dass sie die Transkription des Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitors p21^{cip/waf} (auch bekannt unter den Namen WAF1 oder CIP1), welcher durch den CDKN1A-Locus codiert wird, hochregulieren (Marks et al., 2000; Johnstone et al., 2002 und 2003). Es ist weiter bekannt, dass p21^{cip/waf} in seiner Funktion als natürlicher Inhibitor von Cyclin E-CDK2 und Cyclin A-CDK2 eine wichtige Rolle im Zellzyklusarrest von Tumorzellen spielt (Mac Lachlan et al., 1995); auch die HDAC-I vermittelte Induktion von CDKN1A wird als essentielle Bedingung des G1-Blocks nach HDAC-Inhibition angesehen (Sandor et

al., 2000; Rosato et al., 2001). Im Gegensatz hierzu zeigen Studien mit p21-defizienten Zellen (p21 -/-) allerdings zum Teil divergierende Ergebnisse: während eine Arbeit mit einer humanen kolorektalen Karzinom-Zelllinie erwartungsgemäß eine um ein Vielfaches erhöhte Resistenz gegenüber dem TSA-induzierten G1-Block im Vergleich zu nicht-malignen p21+/+-Zellen feststellte (Kim et al., 2000), kommt eine andere Arbeit mit primären Fibroblastenkulturen transgener p21-Knockout-Mäuse bezüglich des Butyrat-vermittelten G1-Blocks zu einem Ergebnis, welches eine p21-Unabhängigkeit und damit die Existenz zusätzlicher Mechanismen nahe legt (Vaziri et al., 1998).

In der vorliegenden Arbeit konnte eine konzentrationsabhängige Hochregulation von p21^{cip/waf} nach Exposition gegenüber den HDAC-I Wirkstoffen VPA oder ITF2357 in HCC-Zellen beobachtet werden. Diese Daten lassen sich mit bereits beschriebenen Ergebnissen bezüglich HCC-Zellen vereinbaren, welche entweder nach Inkubation von Hepatomzellen mit 4-Phenylbutyrat (Svechnikova et al., 2003) oder TSA (Herold et al., 2002; Yamashita et al., 2003) gewonnen worden waren. Somit konnte nachgewiesen werden, dass VPA und ITF2357 die transkriptionelle Hochregulation von p21^{cip/waf}, eines Schlüsselproteins der Zellzykluskontrolle, in vergleichbarer Art und Weise induzieren wie andere bereits auf der *in vitro* Ebene etablierte HDAC-I Wirkstoffe (z. B. TSA oder Butyrat).

In diesem Kontext muss jedoch beachtet werden, dass p21^{cip/waf} lediglich ein einziges moduliertes Genprodukt darstellt, während einige andere Studien herausarbeiten konnten, dass zwischen 2% und 25% (Van Lint et al., 1996; Glaser et al., 2003; Peart et al., 2005) aller zellulären Gene von HDAC-I relevant reguliert werden. Daher resultiert die Behandlung von Tumorzellen mit HDAC-I in einer komplexen, transkriptionellen Reprogrammierung von Tumorzellen, welche den zellulären Phänotyp grundlegend verändern kann wie erneut auch in dieser Arbeit mit HCC-Zelllinien beobachtet werden konnte.

Bei der weiteren Untersuchung der HCC-Zellen fiel insbesondere auf, dass VPA und ITF2357 einen bedeutenden Einfluss auf die Expression und das zelluläre Gleichgewicht von anti-apoptotischen und pro-apoptotischen Mitgliedern der Bcl-2 Proteinfamilie ausüben: das anti-apoptotische Protein Bcl-X_L, welches in HCC-Zellen bekanntermaßen deutlich erhöht vorhanden ist und dort eine wichtige Determinante der erheblichen Apoptoseresistenz von Hepatomzellen *in vivo* darstellt (Takehara et al., 2001), wurde konzentrationsabhängig durch VPA- und ITF2357-Behandlung herunterreguliert, mit dem ausgeprägtesten Effekt nach Inkubation mit 0,5 µM ITF2357. Ähnliche Ergebnisse konnten für Hepatomzellen *in vitro* in einer anderen Arbeit erst nach einer Kombination aus Serum-Entzug und TSA-Behandlung (Herold et al., 2002) erzielt werden. Interessanterweise wurde in einer kürzlich veröffentlichten Arbeit eine Hochregulation von Bcl-X_L in primären Rattenhepatozyten beschrieben, welche mit TSA behandelt worden waren (Papeleu et al., 2003), so dass eine differentielle Regulation von Bcl-X_L in malignen Hepatomzellen im Vergleich zu gesunden Hepatozyten einer der Hauptmechanismen für die beobachtete Hepatom-spezifische Apoptoseinduktion durch VPA und ITF2357 sein könnte.

Weiterhin wurde als Reaktion auf die Behandlung mit VPA und ITF2357 eine erhöhte Expression der pro-apoptotischen Bcl-2-Proteine Bid und Bax in den untersuchten HCC-Zellen festgestellt. Im Fall von Bid konnte nicht nur ein mengenmäßiger Zuwachs des aktiven Spaltproduktes tBid festgestellt werden, sondern auch ein zunehmender Proteingehalt an ungespaltenem Bid, so dass durch VPA- und ITF2357-Exposition nicht nur eine verstärkte intrazelluläre Metabolisierung, sondern tatsächlich auch eine erhöhte Expression von Bid zu detektieren war. Für den HDAC-I Wirkstoff SAHA wurde die Induktion der Bid-Spaltung und -Aktivierung bereits als wesentlicher Wirkmechanismus charakterisiert, über welchen die Substanz durch mitochondriale Membranschädigung und konsekutive Freisetzung reaktiver Sauerstoffradikale in der Lage ist, unabhängig von einer Caspasenaktivierung den Zelltod einzuleiten

(Ruefli et al., 2001). Die vorliegenden Ergebnisse zeigen zwar einerseits, dass Bid auch bei der Reaktion von Hepatomzellen auf VPA und ITF2357 eine prominente Rolle spielen dürfte, jedoch geht die durch diese Substanzen induzierte Apoptose, wie für andere HDAC-I (Amin et al., 2001), aber auch für SAHA (Henderson et al., 2003) vorbeschrieben, mit einer deutlichen Aktivierung von Caspasen als klassisches Zeichen für apoptotischen Zelltod einher.

Die hier aufgezeigten intrazellulären Veränderungen induzieren eine deutliche Verschiebung des Verhältnisses zwischen anti-apoptotischen und pro-apoptotischen Molekülen in der Zelle zugunsten der pro-apoptotischen Faktoren. Somit erscheint es sehr wahrscheinlich, wie in der schematischen Darstellung in Abb. 23 illustriert, dass dieses Ungleichgewicht mit der entscheidende Faktor für die VPA- und ITF2357-Wirkung auf Hepatomzellen sein dürfte.

Diese Hypothese wurde durch die Ergebnisse der sub2n-DNA-Quantifizierung in HepG2-Zellen, welche vor Inkubation mit VPA und ITF2357 mit einem Bcl-X_L-tragenden Plasmid transfiziert worden waren, bestätigt. Durch die partielle Revision des Übergewichtes von pro-apoptotischen Faktoren, wie sie durch die HDAC-Inhibition in HCC-Zellen zustande gekommen war, konnte in diesem Ansatz die Apoptoserate durch eine Bcl-X_L Überexpression empfindlich gesenkt werden. Dieses Experiment unterstreicht die Bedeutung von Bcl-X_L und damit auch die Wichtigkeit der intrinsischen Apoptosesignalkaskade für den VPA- und ITF2357-vermittelten Zelltod, womit sich auch die in der Literatur beschriebenen Daten bezüglich anderer HDAC-I sehr gut vereinbaren lassen (Vrana et al., 1999; Bernhard et al., 1999).

Andere inhibitorische Faktoren des programmierten Zelltodes wie Bcl-2 selbst oder Mitglieder der Proteinfamilie „Inhibitor of apoptosis proteins“ (IAP) könnten durch HDAC-I in einer ähnlichen Weise reguliert werden und dadurch ebenfalls zumindest teilweise zum beobachteten Phänotyp der HCC-Zellen beitragen, so

dass derzeit weitere Untersuchungen durchgeführt werden, um die Rolle dieser Apoptose-modulierenden Proteine in der Signaltransduktion des VPA- und ITF2357-vermittelten Zelltodes noch detaillierter aufzuklären.

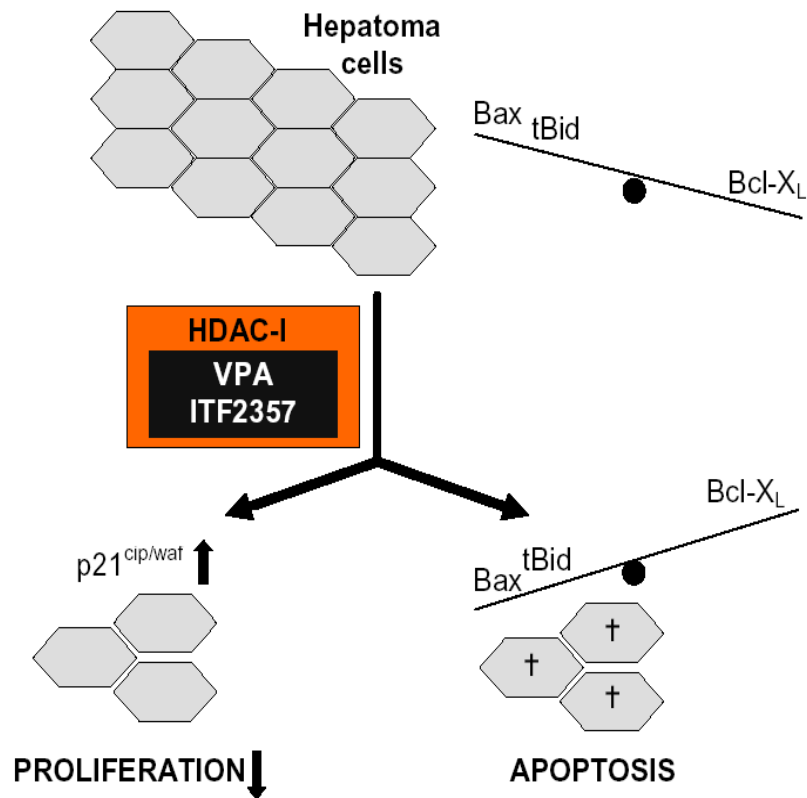


Abb. 23: Schematische Zusammenfassung der VPA- und ITF2357-induzierten Reaktionen in HCC-Zellen. HDAC-I führen in Hepatomzellen zur Inhibition der Zellproliferation (linke Seite) und zur Induktion von Apoptose (rechte Seite). Beide Substanzen, VPA und ITF2357, induzierten eine "Reprogrammierung" der untersuchten Hepatomzellen, indem sie die transkriptionelle Regulation definierter Gene modulieren. Die daraus folgende intrazelluläre Verschiebung des Gleichgewichts zwischen pro-apoptotischen (z.B. Bax and tBid) und anti-apoptotischen (z.B. Bcl-X_L) Proteinen in Richtung Apoptose dürfte eine entscheidende Bedeutung für die erhöhte Empfindlichkeit humaner Hepatomzellen gegenüber HDAC-I vermittelter Apoptose haben. Abb. entnommen aus Armeanu et al., 2005.

4.3 Überwindung von Resistenzphänomenen durch Hemmung der Histoneacetylase-Aktivität in humanen Hepatomzellen

Der Todesrezeptor-Ligand *TNF-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL) ist ein Zytokin der Tumor-Nekrose-Faktor Familie, das in der Lage ist, in einer Vielzahl von Tumorzellarten selektiv Apoptose zu induzieren. Im Gegensatz zu anderen Mitgliedern der Tumor-Nekrose-Faktor Familie, wie TNF α oder Fas-Ligand, deren Zytotoxizität für nicht-maligne Zellen einen therapeutischen Einsatz stark limitiert (Havell et al., 1988; Ogasawara et al., 1993), wird TRAIL im allgemeinen von gesunden Parenchymzellen gut toleriert (Ashkenazi et al., 1999; Kelley et al., 2004), so dass TRAIL seit seiner Erstbeschreibung 1997 als eine viel versprechende und innovative Option in der Therapie hämatologischer und solider Tumoren betrachtet wird.

Leider erwiesen sich das Hepatozelluläre Karzinom (Yamanaka et al., 2000; Kim et al., 2002; Chen et al., 2003) wie auch einige andere Tumorentitäten (Gliniak et al., 1999; Lacour et al., 2001) als in hohem Maße resistent gegenüber löslichem TRAIL, wodurch einer therapeutischen Anwendung in diesem Kontext bisher keine Bedeutung zukam. Um künftig TRAIL trotzdem für eine HCC-Therapie nutzbar zu machen, ist es notwendig, die primäre Resistenz von Hepatomzellen gegenüber einer TRAIL-vermittelten Apoptose zu überwinden, so dass eine intensive Suche nach entsprechenden Substanzen derzeit durchgeführt wird.

Die Sensibilisierung TRAIL-resistenter Zellen durch Chemotherapeutika ist ein schon länger bekanntes Phänomen und wurde als solches bereits in einigen Arbeiten beschrieben. Insbesondere für TRAIL-resistente Kolonkarzinom-Zelllinien ist eine Sensibilisierungen gegenüber TRAIL durch Zusatz verschiedenster chemotherapeutischer Substanzen wie Cisplatin, Doxorubicin (Lacour et al., 2001) oder Camptothecin (Gliniak et al., 1999) beschrieben worden. Vergleichbare Daten gibt

es auch für Etoposid in Glioblastomzellen (Nagane et al., 2000) sowie weiteren epithelialen Tumorzelllinien (Gibson et al., 2000).

In HCC-Zellen wurde ebenfalls eine signifikant erhöhte Apoptoserate durch TRAIL in Anwesenheit der Chemotherapeutika Doxorubicin, Camptothecin, Actinomycin D und Cisplatin beobachtet (Yamanaka et al., 2000; Shin et al., 2002). In den meisten dieser Untersuchungen, insbesondere in den HCC-Studien wurde jedoch eine mögliche parallel induzierte Sensibilisierung nicht-maligner Zellen, die eine gravierende Limitation der Anwendbarkeit bedeuten würde, nicht im Detail untersucht.

In dieser Arbeit wurden deshalb die Möglichkeiten zur Sensibilisierung von TRAIL-resistenten HCC-Zellen gegenüber der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose durch HDAC-Inhibition in umfassender Weise untersucht. Überraschend konnte mit den Substanzen VPA und ITF2357 zum ersten Mal demonstriert werden, dass HDAC-I in der Lage sind, durch Veränderungen in der transkriptionellen Regulation die Empfindlichkeit von HCC-Zelllinien gegenüber TRAIL deutlich zu erhöhen.

Zunächst verdeutlichte die durchflusszytometrische Untersuchung von HepG2-Zellen nach Inkubation mit TRAIL die bereits bekannte Resistenz der HCC-Zellen gegenüber dem Todesliganden. Dagegen zeigten die Hepatomzellen nach einer Kombinationsbehandlung mit VPA bzw. ITF2357 und TRAIL eine deutliche Induktion des apoptotischen Zelltodes. Anschließende Experimente konnten eruieren, dass sich die Zelltodraten deutlich erhöhen ließen, wenn die Zellen eine 24-stündige Vorinkubation mit HDAC-I vor der TRAIL-Zugabe erfuhren und eine Koinkubation mit beiden Substanzen (HDAC-I + TRAIL) für weitere 24 h fortgeführt wurde. Auch für weitere HCC-Zelllinien wie HuH-7 und PLC/PRF/5 konnten die HDAC-I Wirkstoffe VPA und ITF2357 die Empfindlichkeit von Hepatomzellen gegenüber TRAIL deutlich erhöhen.

Weiterhin wurde deutlich, dass aufgrund der Reversibilität der Histonhyperacetylierung eine persistierende HDAC-Inhibition während der gesamten Inkubationsperiode notwendig war, um die TRAIL-Resistenz von HCC-Zellen zu überwinden und dass andernfalls, bei zu kurzer VPA- bzw. ITF2357-Präsenz, lediglich deutlich schwächere Apoptoseraten erreicht werden konnten.

In der Literatur wurden bisher vergleichbare „priming“-Effekte gegenüber TRAIL durch HDAC-I für die Substanzen LAQ824 (Gou et al., 2004) sowie TSA und Depsipeptide (Inoue et al., 2004) in unterschiedlichen TRAIL-resistenten, leukämischen Zelllinien beschrieben. Im Bereich der soliden Tumoren konnten ähnliche Ergebnisse für Kolonkarzinom-Zelllinien (Hernandez et al., 2001; Inoue et al., 2002) erzielt werden.

Die in dieser Arbeit mit den neuen HDAC-I Wirkstoffen VPA und ITF2357 erhobenen Daten konnten zum ersten Mal die Möglichkeit einer TRAIL-Sensitivierung von Hepatomzellen durch HDAC-I aufzeigen, so dass sich auf dieser neu gefundenen Basis erstmals auch für das HCC neuartige Therapieoptionen eröffnen.

4.4 Molekulare Mechanismen einer HDAC-I vermittelten TRAIL-Sensibilisierung von Hepatomzellen

Die molekularen Mechanismen einer TRAIL-Resistenz von Tumorzellen sind bisher nur unvollständig verstanden. Nachdem zunächst angenommen wurde, dass die relative Verteilung von pro-apoptotischen TRAIL-Rezeptoren versus nicht aktiven Decoy-Rezeptoren der entscheidende Faktor in der Determinierung der TRAIL-Sensitivität darstellen könnte (Pan et al., 1997), gibt es inzwischen immer mehr Hinweise dafür, dass in erster Linie dysregulierte intrazelluläre Apoptose-Signaltransduktionswege für die TRAIL-Resistenz von Tumorzellen verantwortlich

sind (Yagita et al., 2004); dies scheint insbesondere auch für TRAIL-resistente Hepatomzellen zu gelten.

Studien, welche eine differentielle Expression der pro-apoptischen Rezeptoren TRAIL-R1 und -R2 in TRAIL-resistenten HCC-Zelllinien analysierten, fanden verglichen zu Normalgewebe eine ausreichend hohe Expression dieser Rezeptoren (Yamanaka et al., 2000), so dass eine verminderte Rezeptordichte an der Zelloberfläche als Grund für die TRAIL-Unempfindlichkeit von Hepatomzellen als unwahrscheinlich angesehen werden kann.

Mehrere Arbeiten zu unterschiedlichen Tumorentitäten beschreiben hinsichtlich der Chemotherapeutika-induzierten TRAIL-Sensibilisierung eine Korrelation zwischen TRAIL-vermittelter Apoptose und dem Expressionsniveau von TRAIL-R1 und -R2 (Lacour et al., 2001; Gibson et al., 2000). Allerdings gibt es Daten für HCC-Zellen, die veranschaulichen, dass eine gesteigerte mRNA-Expression von TRAIL-R1 nach Cisplatinbehandlung mit nachfolgender TRAIL-Sensibilisierung zwar in manchen Zelllinien beobachtet werden kann, dies allein aber keine hinreichende Erklärung für die synergistischen Effekte ist, da es auch HCC-Zelllinien gibt, welche die gleiche TRAIL-Sensibilisierung erfahren, ohne jedoch eine entsprechende Hochregulation von TRAIL-R1 zu bieten (Shin et al., 2002).

Kürzlich wurde für Leukämiezelllinien eine Korrelation zwischen einer Hochregulation pro-apoptischer TRAIL-Rezeptoren und einer HDAC-I vermittelten TRAIL-Sensibilisierung beschrieben (Gou et al., 2004). Diese Ergebnisse lassen sich mit den Daten der vorliegenden Studie mit Hepatomzellen nicht vereinbaren, welche in HepG2-Zellen als Reaktion auf VPA- oder ITF2357-Exposition mittels RT-PCR keinerlei veränderte TRAIL-R1- und -R2-Expression auf mRNA-Ebene feststellen konnte. Auch durchflusszytometrisch war nach ITF2357-Inkubation keine Veränderung und nach VPA-Behandlung sogar eine konzentrationsabhängige Reduktion der Rezeptorexpression auf der Zelloberfläche

nachweisbar. Zusammenfassend implizieren diese Ergebnisse, auch in Übereinstimmung mit bestehenden Daten aus Arbeiten mit HCC-Zellen (Yamanaka et al., 2000; Shin et al., 2002), dass als Erklärung für die gesteigerte Empfindlichkeit von Hepatomzellen gegenüber TRAIL andere Mechanismen als die Rezeptorexpression eine wichtige Rolle spielen dürften.

Ein weiterer wichtiger Fokus bei der Suche nach TRAIL-Resistenzmechanismen von Tumorzellen lag bereits seit längerer Zeit auf dem *Flice-like inhibitory protein* (FLIP) (Kim et al., 2000), welches als intrazellulärer Inhibitor der Caspase 8-Aktivierung und damit auch als potentieller Kandidat für die Blockierung der Todesrezeptor-vermittelten Signalkaskade identifiziert werden konnte. Untersuchungen der zellulären FLIP-Expression ergaben eine konstitutive Expression in HCC-Zelllinien, wohingegen in normalem Lebergewebe eine deutlich geringere (Okano et al., 2003) bis undetektierbare Proteinmenge (Kim et al., 2002) von FLIP vorhanden war. Neuere Arbeiten berichteten weiterhin davon, dass eine Herunterregulierung von FLIP durch Antisense-Oligonukleotide HCC-Zellen für eine TRAIL-vermittelte Apoptose empfänglich machen können (Okano et al., 2003). Hinsichtlich einer HDAC-I induzierten TRAIL-Sensibilisierung gibt es ebenfalls Daten, die zeigen, dass Substanzen, welche in der Lage sind, eine Reduktion des intrazellulären FLIP-Gehaltes hervorzurufen, die Todesrezeptor-vermittelte Apoptose in TRAIL-resistenten humanen Kolonkarzinomzellen (Hernandez et al., 2001) und Leukämiezelllinien (Guo et al., 2004) erleichtern können.

In dieser Arbeit konnte für humane Hepatomzellen nachgewiesen werden, dass eine Behandlung der Zellen mit den HDAC-I Wirkstoffen VPA und ITF2357 zu einer deutlichen Reduktion von FLIP-mRNA-Transkripten sowie intrazellulärem FLIP-Proteingehalt führt, was in der Folge eine Sensibilisierung der Hepatomzellen gegenüber der TRAIL-induzierten Apoptose bewirkt. Im Kontext der bereits bekannten Daten bezüglich der zentralen Rolle von FLIP innerhalb der

extrinsischen Apoptosekaskade unterstützen diese Ergebnisse die Hypothese, dass die Rekonstitution der gestörten Signaltransduktion zwischen Todesrezeptor und Caspase 8-Aktivierung in Hepatomzellen ein Schlüsselereignis darstellt, welches entscheidend zur Überwindung der TRAIL-Resistenz durch Histondeacetylase-Inhibition beiträgt.

Im Gegensatz zu unseren Untersuchungen berichteten zwei aktuelle Arbeiten mit TRAIL-sensitiven Leukämiezelllinien (Nebbioso et al., 2005; Insinga et al., 2005) von einer HDAC-I vermittelten Hochregulation von TRAIL selbst, welche über eine autokrine Sekretion eine effiziente Apoptoseinduktion in diesen Tumorzellen hervorrufen kann. Weiterhin wurde vermutet, dass die Induktion von TRAIL eine entscheidende Funktion in der tumorspezifischen, apoptotischen Aktivität von HDAC-I erfüllen könnte, da normale Zellen in der Regel nicht empfindlich gegenüber TRAIL sind. Diese Annahme konnte schlüssig, wie in beiden Arbeiten demonstriert wurde, für per se TRAIL-sensitive Tumorzellen nachgewiesen werden. Im Gegensatz hierzu kann jedoch für Tumorentitäten, wie z.B. das Hepatozelluläre Karzinom, welches sich durch eine TRAIL-Resistenz auszeichnet, dieser Mechanismus nicht als Erklärung für die Resensibilisierung der Tumorzellen dienen.

So ist es naheliegend, eine unterschiedliche Modulation der TRAIL-Aktivität in TRAIL-sensiblen und -resistenten Zellen durch HDAC-I zu postulieren, wie in der schematischen Darstellung in Abb. 24 zusammenfassend illustriert wird. Während HDAC-I Wirkstoffe in TRAIL-sensiblen Tumorzellen den programmierten Zelltod über eine Signalkaskade initiieren können, welche durch die autokrine Sekretion des Todesliganden TRAIL getriggert wird, ist in TRAIL-resistenten Zellen, wie den Hepatomzellen, dieser Signaltransduktionsweg blockiert. Durch die konstitutive Expression von anti-apoptotischen Genen wie z. B. FLIP, welche substantiell zur TRAIL-Resistenz beitragen können, wird die Tumorzelle gegenüber der

Todesrezeptor-vermittelten Apoptose resistent, so dass auch eine exogene Zugabe von TRAIL keine Apoptoseinduktion in diesen Zellen zur Folge hat.

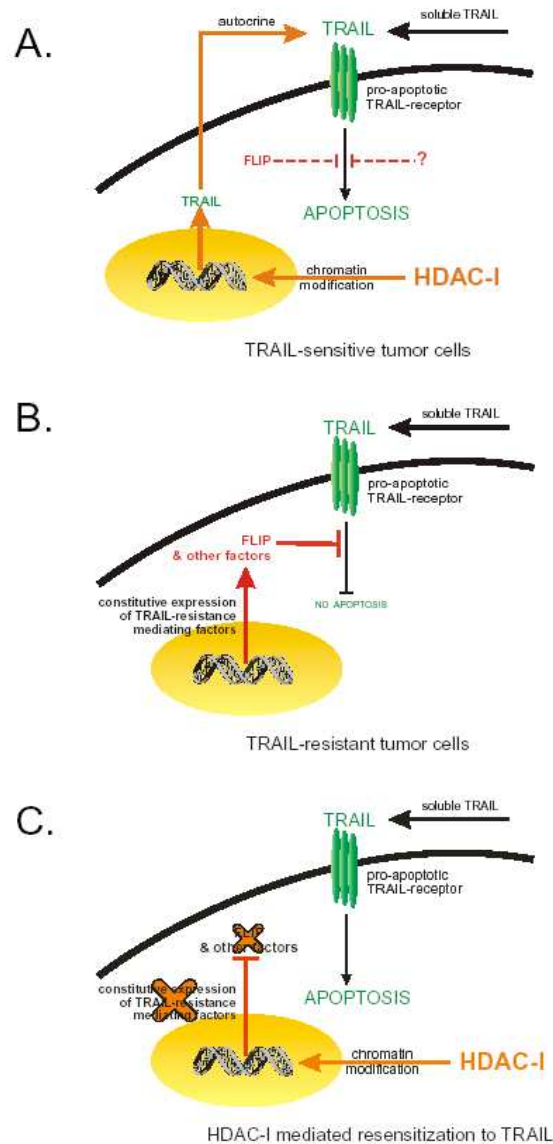


Abb. 24: Schematische Darstellung der HDAC-I vermittelten Modifikation der TRAIL-Aktivität in TRAIL-sensitiven und -resistenten Tumorzellen. (A) HDAC-I induzieren in TRAIL-sensitiven Zellen Apoptose über einen Signalweg, der durch autokrine TRAIL-Sekretion getriggert wird. (B) TRAIL-resistente Zellen, wie z.B. Hepatomzellen, sind durch die Expression von Resistenzfaktoren, wie z.B. FLIP, vor TRAIL-induzierter Apoptose geschützt. (C) HDAC-I resensibilisieren diese Tumorzellen gegenüber TRAIL durch eine Herunterregulation der Expression von Resistenzfaktoren wie z.B. FLIP. Abb. entnommen aus Pathil et al., 2006.

HDAC-I Wirkstoffe sind in der Lage, durch epigenetische Modifikationen die Expression beispielsweise von FLIP, einem bedeutsamen TRAIL-Resistenzfaktor, deutlich zu reduzieren, so dass die Rekonstitution dysregulierter Signaltransduktionswege in TRAIL-resistenten Zellen eine Resensibilisierung gegenüber der extrinsischen Apoptose überhaupt erst ermöglicht.

Zusätzlich zu dem aufgezeigten substantiellen Einfluss eines einzelnen Genproduktes, wie des Caspase-8-Inhibitors FLIP, spielt sicher auch die oben bereits erwähnte komplexe Umprogrammierung der Genexpression durch die HDAC-I Wirkstoffe VPA und ITF2357 eine wichtige Rolle. Die Empfindlichkeit einer Zelle für Todessignale wird durch eine Veränderung der Balance zwischen intrazellulären pro-apoptotischen und anti-apoptotischen Faktoren zusätzlich wesentlich mit beeinflusst. So konnte z. B. die Notwendigkeit von Bax, eines Proteins der Bcl-2-Familie, für eine effiziente Todesrezeptor-vermittelte Apoptose durch TRAIL in mehreren aktuellen Arbeiten mit Kolonkarzinomzellen demonstriert werden (Deng et al., 2002; LeBlanc et al., 2002). Die Wichtigkeit des Proteins für die TRAIL-Signaltransduktion wurde außerdem durch eine Studie mit Bax/Bak-Doppel-Knockout-Zellen unterstrichen, welche aufgrund der Defizienz dieser pro-apoptotischen Faktoren einen äußerst Zelltod-resistenten Phänotyp ausprägen (Wie et al., 2001).

Zusammenfassend betrachtet modifiziert die HDAC-I induzierte Expressionmodulation von Proteinen der Bcl-2 Familie Schlüsselpositionen im Apoptoseprogramm der Zelle, so dass nach VPA- und ITF2357-Exposition eine insgesamt erhöhte Bereitschaft der Tumorzelle zur Apoptose-Signaltransduktion vorliegt. Diese Erniedrigung der Reizschwelle bildet die Grundlage dafür, dass der Todesligand TRAIL nach dem zusätzlichen Schlüsselereignis der HDAC-I vermittelten FLIP-Reduktion eine massive Apoptose in TRAIL-resistenten Hepatomzellen auslösen kann.

4.5 Klinische Anwendungsperspektive durch fehlende Toxizität von HDAC-I und TRAIL für primäre humane Hepatozyten

Epigenetische Modifikationen von Histonproteinen durch HDAC-I Wirkstoffe können prinzipiell sowohl in malignen als auch in normalen Zellen stattfinden. Dennoch besitzen diese Substanzen, was die Induktion des programmierten Zelltodes angeht, eine bemerkenswerte Selektivität für maligne Zellen, so dass HDAC-I keine toxischen Nebenwirkungen in normalem Gewebe *in vitro* und *in vivo* aufzuweisen scheinen (Richon et al., 1998; Butler et al., 2000). Dies wirft die Frage auf, warum diese Substanzen bezüglich ihrer zytotoxischen und apoptotischen Effekte eine Präferenz für transformierte Zellen zeigen, während gesunde Parenchymzellen nicht in ihrer Viabilität beeinträchtigt werden.

Eine aktuelle Studie konnte nachweisen, dass die Inkubation von primären Rattenhepatozyten mit TSA in diesen Zellen zwar ähnlich wie in Tumorzellen eine Proliferationsinhibition bewirkt, jedoch im Gegensatz zu Hepatomzellen keine Zeichen einer Apoptoseinduktion hervorruft (Papeleu et al., 2003).

Diese Daten passen auch zu den mit VPA und ITF2357 in der vorliegenden Arbeit gewonnenen Ergebnissen: im Gegensatz zu der beobachteten Zytotoxizität der HDAC-I Wirkstoffe in HCC-Zellen wies die Inkubation nicht transformierter primärer humaner Hepatozyten (PHH) mit VPA und ITF2357 in Konzentrationsbereichen, in denen deutliche apoptotische Effekte in Hepatomzellen sichtbar waren, keine messbaren toxischen Nebenwirkungen auf.

VPA-behandelte PHH zeigten selbst in der höchsten applizierten Konzentration von 4 mM VPA lediglich einen konzentrationsabhängigen Anstieg der Transaminasen ALT und AST auf 67% des Ausgangswertes sowie eine unveränderte Abnahme der LDH-Aktivität. Diese Daten, die für eine gute Toleranz gesunder Leberzellen gegenüber VPA sprechen, gehen konform mit den klinischen Erfahrungen bezüglich des etablierten Antikonvulsivums Valproinsäure (VPA),

welche diesem eine gute Verträglichkeit und eine geringe Hepatotoxizität attestieren, die sich nur in seltenen Fällen - insbesondere bei Kindern unter 2 Jahren - mit antikonvulsiven Kombinationstherapien manifestiert (Dreifuss et al., 1987). Auf der Basis dieses vorteilhaften Nebenwirkungsprofils könnten die bereits für andere Tumorentitäten beschriebenen antineoplastischen Effekte des Antiepileptikums VPA (Blaheta et al., 2002) auch für das HCC therapeutisch nutzbar gemacht werden. Analog zu den Daten für VPA zeigen die hier auch für die Substanz ITF2357 gewonnenen Daten ein ebenfalls sehr gutes Verträglichkeitsprofil, so dass auch bei den höchsten getesteten Konzentrationen unter *in vitro* Bedingungen keine Toxizität für PHH festzustellen war.

Eine mögliche Erklärung für das selektive Überleben von normalen Zellen versus apoptotischem Untergang von malignen Zellen könnte in der offenkundig unterschiedlichen Regulation der Zellteilung liegen. In Untersuchungen an untransformierten humanen Fibroblasten, welche mit HDAC-I behandelt worden waren, zeigte sich, dass diese Substanzen einen G2-Block triggern können, der sich mit einer Blockade des Zellzyklus mit nur geringer oder gar keiner Zytotoxizität manifestiert (Qiu et al., 2000). In gesunden Zellen scheinen HDAC-I also einen G2-Kontrollpunkt zu induzieren, welcher einen protektiven Einfluss hat, indem er die Zellen daran hindert, unmittelbar nach HDAC-I-Exposition in die Mitose zu gehen. Auf diese Weise entgehen sie einer Apoptoseinduktion, ohne eine relevante Zellschädigung zu erfahren.

Die meisten Tumorzellen hingegen sind defizient in derartigen Signalwegen, da sie die Funktionalität der meisten Zellzyklus-Kontrollpunkte, wie z. B. des CDKN1A-Lokus im Laufe der Karzinogenese, gewissermaßen als Vorbedingung für eine maligne Entartung, verloren haben (Hanahan et al., 2000). So können transformierte Zellen trotz HDAC-Inhibition ihre DNA replizieren und werden damit konsekutiv für den programmierten Zelltod sensibilisiert (Burgess et al., 2001; Vrana et al., 1999).

Obwohl die HDAC-I Wirkstoffe VPA und ITF2357 in der Toxizitätsanalyse ein äußerst günstiges Nebenwirkungsprofil in gesunden Hepatozyten demonstriert hatten (Armeanu et al., 2005), musste eine ähnlich geringe Toxizität für die kombinierte Anwendung von HDAC-I und TRAIL erneut verifiziert werden, insbesondere da die Leber bezüglich unerwünschter Nebenwirkungen des Zytokins vermutlich eines der sensibelsten Gewebe überhaupt darstellt (Jo et al., 2000; Lawrence et al., 2001).

Nachdem die ersten präklinischen Studien dem Wirkstoff TRAIL die Eigenschaften Tumorselektivität (Pitti et al., 1996; Walczak et al., 1999) und geringe systemische Toxizität (Walczak et al., 1999; Ashkenazi et al., 1999) attestieren konnten, schien einer potentiellen Anwendung von TRAIL in der Krebstherapie nichts im Wege zu stehen. Für die meisten Gewebearten und ihre korrespondierenden Tumoren traf diese Idealkonstellation aus TRAIL-resistentem, gesundem Gewebe und TRAIL-sensitiven Malignomen auch zu.

Bei einer Untersuchung der TRAIL-Sensitivität von Hepatozyten verschiedener Spezies mit einer speziellen Präparation von TRAIL zeigte sich jedoch, dass im Gegensatz zu Leberzellen von Mäusen, Ratten oder Affen, eine massive Apoptoseinduktion mit dieser speziellen TRAIL-Präparation ausgelöst werden kann (Jo et al., 2000). Im Gegensatz hierzu werden andere Präparationen von TRAIL von Hepatozyten komplikationslos vertragen (Lawrence et al., 2001). Als wichtiges Ergebnis aus diesen Betrachtungen muss für jedes therapeutisch neue Einsatzgebiet von TRAIL insbesondere eine Hepatotoxizität ausgeschlossen werden, so dass es für die Aussagekraft der hier dargestellten Daten von essentieller Bedeutung war, potentiell zellschädigende Effekte einer Kombinationsbehandlung von VPA bzw. ITF2357 und TRAIL an primären humanen Hepatozyten detailliert zu charakterisieren, anstatt sich rein auf nicht-humane Leberzellen oder auf Nicht-Lebergewebe zu beschränken.

Um auch der großen interindividuellen Variabilität von Hepatozyten bezüglich der zellulären Reaktion auf toxische Schädigungen Rechnung zu tragen, wurden PHH von fünf verschiedenen gesunden Individuen in die Bestimmung der Leberenzyme und der LDH-Aktivität nach HDAC-I-Exposition mit eingeschlossen. Die durchgeführte Toxizitätsanalyse zeigte eine gute Verträglichkeit der Kombinationsbehandlung von VPA bzw. ITF2357 und TRAIL ohne Zeichen einer Toxizität für primäre, humane Hepatozyten, während die in der LDH-Bestimmung mitgeführten Hepatomzellen (HepG2) bei gleichen Konzentrationen eine signifikant höhere Zytotoxizität aufwiesen.

Interessanterweise konnte dieser bemerkenswerte Unterschied in der Vulnerabilität gegenüber HDAC-I und TRAIL auf ein differentielles Regulationsmuster von FLIP in Hepatomzellen und gesunden Leberzellen zurückgeführt werden. Während maligne HCC-Zellen auf HDAC-Inhibition mit einer deutlichen Herunterregulierung der FLIP-Expression reagierten, boten primäre, humane Hepatozyten ein völlig entgegengesetztes Bild und demonstrierten eine signifikante Hochexpression von FLIP-mRNA Transkripten und FLIP-Protein. Diese experimentellen Ergebnisse legen nahe, dass HDAC-I nicht nur in der Lage sind, die TRAIL-Resistenz von Hepatomzellen effizient zu durchbrechen, ohne dabei gesundes Leberparenchym zu beeinträchtigen, sondern dass sie darüber hinaus auch durch eine Hochregulation von FLIP einen protektiven Effekt auf nicht-maligne Leberzellen ausüben, der diese vor einer potentiellen, TRAIL-induzierten Zytotoxizität schützen kann.

Zusammenfassend unterstreichen die vorliegenden Daten eindrücklich die Relevanz des hier charakterisierten experimentellen Ansatzes. Die Kombinations-therapie aus einem der HDAC-I Wirkstoff (VPA bzw. ITF2357) und dem Zytokin TRAIL stellt ein innovatives Konzept dar, welches eine potente, therapeutische Strategie in der HCC-Behandlung anbietet, deren klinischer Einsatz nicht durch eine fulminante Hepatotoxizität limitiert wird.

4.6 Schlussfolgerung

HDAC-I Wirkstoffe sind viel versprechende neue „Biomodulatoren“, welche durch Veränderung der transkriptionellen Regulation von Genen, Differenzierung, Wachstumsinhibition und Zelltod in Tumorzellen auslösen können. Aufgrund der Vielfalt der Resistenzmechanismen unterschiedlicher Tumorentitäten und der speziellen therapeutischen Probleme einzelner Malignome, wie z. B. die besonders hartnäckige Resistenz des Hepatozellulären Karzinoms gegenüber Chemotherapeutika, ist es von enormer Wichtigkeit, neue Mitglieder dieser interessanten Substanzklasse der HDAC-I Wirkstoffe zu charakterisieren, um sie für einen potentiellen Einsatz in der Krebstherapie zu erschließen.

In dieser Arbeit wurden die Antitumoreffekte des Antikonvulsivums VPA und der neu entwickelten Substanz ITF2357 in ihrer Funktion als HDAC-I Wirkstoffe in HCC-Zellen charakterisiert.

Zusammenfassend führten beide Substanzen zur Akkumulation von hyperacetylierten Histonen, zur Proliferationsinhibition und zur Apoptoseinduktion in verschiedenen Hepatomzelllinien, ohne dabei eine signifikante Toxizität in normalen PHH auszulösen. Diese Ergebnisse implizieren ein Hepatomspezifisches Wirkungsspektrum von VPA und ITF2357, was die Option einer neuartigen therapeutischen Strategie in der HCC-Behandlung eröffnet, deren Effektivität in malignem Gewebe nicht durch eine signifikante Toxizität im gesunden Leberparenchym limitiert wird.

VPA und ITF2357 demonstrierten weiterhin die Fähigkeit, den Caspase-8-Inhibitor FLIP in TRAIL-resistenten Hepatomzelllinien herunter zu regulieren, wodurch eine Resensibilisierung gegenüber Todesrezeptor-Liganden der TNF-Familie und damit gegenüber der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose ermöglicht wird. Die Kombinationsbehandlung von VPA bzw. ITF2357 mit TRAIL wies in primären

humanen Hepatozyten, verglichen zu der in HCC-Zellen induzierten dramatischen Zytotoxizität, keine Zeichen von toxischen Wirkungen auf, was u. a. auf eine HDAC-I induzierte, protektiv erhöhte zelluläre FLIP-Menge in den PHH zurückgeführt werden kann. Dieses Konzept definiert damit ein bisher nicht vorhandenes therapeutisches Fenster für eine potentielle klinische Anwendung von TRAIL in der zukünftigen Behandlung des Hepatozellulären Karzinoms mit einer differentiellen Wirkung auf Tumor- und Nichttumorzellen.

Diese viel versprechenden *in vitro*-Daten der Histondeacetylase-Inhibitoren VPA und ITF2357 bezüglich ihrer Wirksamkeit in Hepatomzellen sollen als Grundlage für die Entwicklung eines alternativen Therapiekonzeptes in der zukünftigen HCC-Behandlung dienen. In diesem Kontext ist es unumgänglich, VPA und ITF2357 bzw. die Kombination dieser HDAC-I Wirkstoffe mit TRAIL in Hinblick auf ihre *in vivo*-Wirksamkeit sowie die Effekte einer mittel- bis langfristigen Anwendung weiterführend zu evaluieren. Während VPA durch die extensiven klinischen Erfahrungen im Einsatz dieses Wirkstoffes als Antikonvulsivum bereits jetzt als sichere und vielfach getestete Alternative zu klassischen, klinisch schlecht verträglichen HDAC-I Wirkstoffen (z. B. TSA oder Trapoxin) in der Tumorthherapie betrachtet werden kann, liegen für ITF2357 ebenfalls ermutigende erste Daten aus klinischen Studien, die bei nicht onkologischen Indikationen durchgeführt worden sind, vor.

Um aus diesen experimentellen Daten zukünftig ein tragfähiges Therapiekonzept für die HCC-Behandlung zu konzipieren, ist im weiteren Verlauf insbesondere eine präklinische Charakterisierung an entsprechenden Tiermodellen und eine nachfolgende Phase I/II Studie notwendig, um möglichst viele der noch offenen Fragen zu klären und die therapeutische Umsetzbarkeit des hier postulierten, innovativen Behandlungskonzeptes für das Hepatozelluläre Karzinom zu ermöglichen.

5 Zusammenfassung

Acetylierungs- und Deacetylierungsprozesse von DNA-assoziierten Histonproteinen durch das gegensätzlich arbeitende Enzym­paar Histondeacetylase (HDAC) und Histonacetyltransferase (HAT) erlauben feinste Modulierungen der zellulären Genexpression und Differenzierung auf epigenetischer Ebene. In transformierten Zellen kann mit Hilfe von sogenannten HDAC-Inhibitoren (HDAC-I) eine therapeutisch intendierte Histonhyperacetylierung erzielt werden, die über eine posttranslationale Modifikation lysinreicher Enden der Histonproteine eine Veränderung der Nukleosomenstruktur und damit eine Reaktivierung von Genen bewirkt. Interessanterweise üben die durch HDAC-Überexpression reprimierten Gene in diesen Zellen Kontrollfunktionen bei Proliferation, Differenzierung und dem zellulären Selbstmordprogramm aus. Durch Hemmung der HDAC Aktivität kann der weiteren Progression der malignen Entartung und der Aufrechterhaltung eines malignen Phänotyps transformierter Zellen entgegengetreten werden. In der Konsequenz der genetischen „Reprogrammierung“ können die entarteten Zellen in die Apoptose getrieben werden.

In dieser Dissertation wurden zwei neuartige, bisher wenig in ihrer Funktion als HDAC-I charakterisierte Substanzen, das Antikonvulsivum Valproat (VPA) und der Wirkstoff ITF2357, bezüglich ihrer zytotoxischen Wirkungen und molekularen Effekte sowohl auf die Hepatomzelllinien HepG2, PLC/PRF/5 und HuH-7, als auch auf primären, humanen Hepatozyten (PHH) charakterisiert.

Die HDAC-I induzierte Histonhyperacetylierung führte in den untersuchten Hepatomzellen zu einer deutlichen konzentrationsabhängigen Inhibition der Proliferation, die nach 5-tägiger Exposition gegenüber VPA oder ITF2357 ein komplettes Absterben der Hepatomzellkulturen zur Folge hatte. Durchflusszytometrische Untersuchungen sowie die fluorimetrische Bestimmung

der Caspase-3-Aktivität nach Behandlung von Hepatomzellen bestätigten die Fähigkeit der untersuchten HDAC-I zur Apoptoseinduktion. Analog behandelte primäre, humane Hepatozyten boten im Gegensatz zu den Hepatomzellen keine messbaren Zeichen einer Zytotoxizität durch die HDAC-I Behandlung.

Die Veränderung des Epigenoms durch Blockade der Histondeacetylase ging mit einer veränderten Expression von zentralen zellzyklus- und apoptoseregulierenden Proteinen einher. Durch die Hochexpression des cyclinabhängigen Kinaseinhibitors p21 und proapoptotischen Mitgliedern der Bcl-2 Familie, wie Bid und Bax, sowie durch die Herunterregulierung von anti-apoptotischer Familienmitglieder wie Bcl-X_L, verschoben VPA und ITF2357 die intrazelluläre Balance zwischen pro- und anti-apoptotischen Signalen in Richtung Apoptose. Die durch Transfektion eines Bcl-X_L kodierenden Plasmids erreichte artifizielle Überexpression von Bcl-X_L in HepG2-Zellen, konnte die VPA- bzw. ITF2357-induzierte Zelltodrate deutlich reduzieren, so dass in der Zusammenschau ein Übergewicht von pro-apoptotischen Faktoren in den Hepatomzellen entscheidend zur HDAC-I vermittelten Apoptoseinduktion beizutragen scheint.

Der zweite Teil der Dissertation befasste sich mit den Wechselwirkungen einer Kombinationsbehandlung aus den HDAC-I VPA oder ITF2357 mit dem Zytokin *TNF-related apoptosis inducing ligand* (TRAIL). Der Todesligand TRAIL ist eine viel versprechende, neue Substanz in der experimentellen Tumorthherapie, welche in unterschiedlichsten Tumorentitäten selektiv den programmierten Zelltod induzieren kann, ohne dabei gesundes Gewebe zu schädigen. Leider ist den malignen Hepatomzelllinien eine ausgeprägte TRAIL-Resistenz eigen, so dass dem Zytokin auf der Suche nach therapeutischen Strategien gegen das Hepatozelluläre Karzinom bisher keine bedeutende Rolle zukam.

In der vorliegenden Arbeit konnte gezeigt werden, dass eine HDAC-I verursachte „Reprogrammierung“ in der Lage ist die TRAIL-Resistenz von Hepatomzellen zu

überwinden und sie gegenüber der Todesrezeptor-vermittelten Apoptose zu sensibilisieren.

Während TRAIL alleine keine relevante Apoptose auslösen konnte, rekonstituierte eine 24-stündige Präinkubation mit VPA bzw. ITF2357 die Empfindlichkeit der Hepatomzellen gegenüber dem Todesliganden, so dass eine anschließende TRAIL-Behandlung in allen untersuchten Hepatomzelllinien eine deutliche Zu-nahme der durchflusszytometrisch gemessenen Zelltodrate zur Folge hatte. Aufgrund der Reversibilität der Histonhyperacetylierung war eine, die gesamte Inkubationsperiode überdauernde HDAC-Inhibition durch VPA oder ITF2357 notwendig, um eine maximale Apoptoseinduktion zu ermöglichen.

Im Gegensatz zu TRAIL-sensiblen Tumorzellarten, wo vermutet wird, dass eine HDAC-I vermittelte Hochregulation der TRAIL-Rezeptoren für eine gesteigerte Empfindlichkeit gegenüber der TRAIL-induzierten Apoptose mitverantwortlich ist, boten die TRAIL-resistenten Hepatomzellen nach HDAC-I Behandlung keine Veränderung der TRAIL-Rezeptorexpression.

Als zentraler Mechanismus für die TRAIL-Sensibilisierung von Hepatomzellen konnte hingegen die Regulation des Apoptose-modulierenden Moleküls FLIP durch VPA und ITF2357 identifiziert werden. Die Expression des anti-apoptotischen Caspase-8 Inhibitors wurde in den untersuchten Hepatomzellen durch HDAC-Inhibition sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene deutlich herunterreguliert. Die Reduktion dieses bekannten intrazellulären TRAIL-Resistenzfaktors scheint ein Schlüsselereignis bei der Induktion einer Empfindlichkeit maligner HCC-Zellen gegenüber der TRAIL-induzierten Apoptose zu sein.

Zur Erfassung einer potentiellen Hepatotoxizität der Kombination von HDAC-I und TRAIL für gesundes Leberparenchym wurden PHH von fünf verschiedenen Spendern nach Kultur mit VPA oder ITF2357 und TRAIL Bestimmungen der

Transaminasen- und LDH-Aktivität unterzogen. Die Wirkstoffkombinationen zeigten in den gesunden Leberzellen ein ausgesprochen gutes Toleranzprofil ohne signifikante Erhöhung der Messwerte, während analog behandelte Hepatomzellen deutliche Zeichen eines massiven Zelluntergangs boten. Die Selektivität der HDAC-I gesteuerten TRAIL-Sensibilisierung korrelierte mit einer differentiellen Regulation von FLIP, welche in den primären Hepatozyten im Gegensatz zu den malignen HCC-Zellen eine Hochexpression von FLIP hervorrief und diese damit vor einer TRAIL-vermittelten Zytotoxizität schützen konnte.

Zusammenfassend unterstreichen die Ergebnisse dieser Arbeit das viel versprechende Wirkungsprinzip von VPA und ITF2357, zwei neuen Wirkstoffen aus der hochinteressanten Substanzklasse der Histondeacetylase-Inhibitoren. Durch die Selektivität ihrer zytotoxischen Effekte eröffnen diese Substanzen die Perspektive für eine innovative und potente Strategie in der HCC-Behandlung, deren klinische Umsetzbarkeit nicht durch ein ungünstiges Nebenwirkungsspektrum bzgl. gesundem Lebergewebe limitiert wird. Nach einer sorgfältigen und kritischen Fortsetzung der präklinischen Evaluation könnte der hier charakterisierte experimentelle Ansatz einer Veränderung des Epigenoms durch VPA und ITF2357 die Grundlage eines neuen Behandlungskonzeptes gegen das Hepatozelluläre Karzinom bilden.

6 Literaturverzeichnis

Ahringer J: NuRD and SIN3 histone deacetylase complexes in development. *Trends Genet*, 2000, 16:351-356

Allfrey VG, Faulkner R, Mirsky AE: Acetylation and methylation of histones and their possible role in the regulation of RNA synthesis. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1964, 51:786-794

Amin HM, Saeed S, Alkan S: Histone deacetylase inhibitors induce caspase-dependent apoptosis and downregulation of DAXX in acute promyelocytic leukemia with t(15;17). *Br J Haematol*, 2001, 115:287-297

Arents G, Burlingame RW, Wang BC, Love WE, Moudrianakis EN: The nucleosomal core histone octamer at 3.1 Å resolution: a tripartite protein assembly and a left-handed superhelix. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1991, 22:10148-10152

Armeanu S, Lauer UM, Smirnow I, Schenk M, Weiss TS, Gregor M, Bitzer M: Adenoviral Gene Transfer of Tumor Necrosis Factor-related Apoptosis-Inducing Ligand Overcomes an Impaired Response of Hepatoma Cells but Causes Severe Apoptosis in Primary Human Hepatocytes. *Cancer Res*, 2003, 63:2369-2372

Armeanu S, Pathil A, Venturelli S, Mascagni P, Weiss TS, Göttlicher M, Gregor M, Lauer UM, Bitzer M: Apoptosis on hepatoma cells but not on primary hepatocytes by histone deacetylase inhibitors valproate and ITF2357. *J Hepatol*, 2005, 42:210-217

Ashkenazi A, Pai RC, Fong S, Leung S, Lawrence DA, Marsters SA, Blackie C, Chang L, McMurtrey AE, Hebert A, DeForge L, Koumenis IL, Lewis D, Harris L, Bussiere J, Koeppen H, Shahrokhi Z, Schwall RH: Safety and antitumor activity of recombinant soluble Apo2 ligand. *J Clin Invest*, 1999, 104:155-162

Bernhard D, Ausserlechner MJ, Tonko M, Löffler M, Hartmann BL, Csordas A, Kofler R: Apoptosis induced by the histone deacetylase inhibitor sodium butyrate in human leukemic lymphoblasts. *FASEB J*, 1999, 13:1991-2001

Blaheta RA, Cinatl J, Jr: Anti-tumor mechanisms of valproate: a novel role for an old drug. *Med Res Rev*, 2002, 22:492-511

Bohm L, Crane-Robinson C: Proteases as structural probes for chromatin: the domain structure of histones. *Biosci Rep*, 1984, 5:365-386

Bradford MM: A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal Biochem*. 1976 May 7;72:248-54

Bruix J, Llovet JM. Prognostic assessment and evaluation of the benefits of treatment. *J Clin Gastroenterol*, 2002, 35: S138-S142

Burgess AJ, Pavey S, Warrener R, Hunter LJ, Piva TJ, Musgrove EA, Saunders N, Parsons PG, Gabrielli BG: Up-regulation of p21(WAF1/CIP1) by histone deacetylase inhibitors reduces their cytotoxicity. *Mol Pharmacol*, 2001, 60:828-837

Burnette WN: "Western blotting": electrophoretic transfer of proteins from sodium dodecyl sulfate--polyacrylamide gels to unmodified nitrocellulose and radiographic detection with antibody and radioiodinated protein A. *Anal Biochem*, 1981, 2:195-203

Burroughs A, Hochhauser D, Meyer T: Systemic treatment and liver transplantation for hepatocellular carcinoma: two ends of the therapeutic spectrum. *Lancet Oncol*, 2004, 7:409-418

Butler LM, Agus DB, Scher HI, Higgins B, Rose A, Cordon-Cardo C, Thaler HT, Rifkind RA, Marks PA, Richon VM: Suberoylanilide hydroxamic acid, an inhibitor of histone deacetylase, suppresses the growth of prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res*, 2000, 60:5165-5170

Carducci M, Bowling MK, Eisenberger M, Sinibaldi V, Chen T, Nor D et al: Phenylbutyrate (PB) for refractory solid tumors: phase I clinical and pharmacologic evaluation of intravenous and oral PB. *Anticancer Res*, 1997, 17:3972-3973

Cary PD, Crane-Robinson C, Bradbury EM, Dixon GH: Effect of acetylation on the binding of N-terminal peptides of histone H4 to DNA. *Eur J Biochem*, 1982, 127:137-143

Chen XP, He SQ, Wang HP, ZhaoYZ, Zhang WG: Expression TNF-related apoptosis-inducing ligand receptors and antitumor effects of TNF-related apoptosis-inducing ligand in human hepatocellular carcinoma. *World J Gastroenterol*, 2003, 11:2433-2440

Dasso M, Dimitrov S, Wolffe AP: Nuclear assembly is independent of linker histones. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1994, 26:12477-12481

Davie JR: Covalent modification of histones: expression from chromatin templates. *Curr Opin Genet Dev*, 1998, 8:173-8

Deng Y, Lin Y, Wu X: TRAIL-induced apoptosis requires Bax-dependent mitochondrial release of Smac/DIABOLO. *Genes Dev*, 2002, 16:33-45

Dreifuss FE, Santilli N, Langer DH, Sweeney KP, Moline KA, Menander KB: Valproic acid hepatic fatalities: a retrospective review. *Neurology*, 1987, 37:379-385

Drummond DC, Noble CO, Kirpotin DB, Guo Z, Scott GK, Benz CC: Clinical Development of Histone Deacetylase Inhibitors As Anticancer Agents. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 2005, 45:495-528

Esteller M, Herman JG: Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumors. *J Pathol*, 2002, 196:1-7

Frey RR, Wada CK, Garland RB, Curtin ML, Michaelides MR, Li J, Pease LJ, Glaser KB, Marcotte PA, Bouska JJ, Murphy SS, Davidsen SK: Trifluoromethyl ketones as inhibitors of histone deacetylase. *Bioorg Med Chem Lett*, 2002, 12:3443-3447

Ganne-Carrie N, Trinchet JC: Systemic treatment of hepatocellular carcinoma. *Eur J Gastroenterol Hepatol*, 2004, 3:275-281

Gibson SB, Oyer R, Spalding AC, Anderson SM, Johnson GL: Increased expression of death receptor 4 and 5 synergizes the apoptosis response to combined treatment with etoposide and TRAIL. *Mol Cell Biol*, 2000, 20:205-212

Glaser KB, Staver MJ, Waring JF, Stender J, Ulrich RG, Davidsen SK: 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*, 2003, 2:151-163

Gliniak B, Le T: Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand's antitumor activity in vivo is enhanced by the chemotherapeutic agent CPT-11. *Cancer Res*, 1999, 59:6153-6158

Gottlicher M, Minucci S, Zhu P, Kramer OH, Schimpf A, Giavara S, Sleeman JP, Lo CF, Nervi C, Pelicci PG, Heinzl T: Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J*, 2001, 20:6969-6978

Guo F, Sigua C, Tao J, Bali P, George P, Li Y, Wittmann S, Moscinski L, Atadja P, Bhalla K: Cotreatment with histone deacetylase inhibitor LAQ824 enhances Apo-2L/tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand-induced death inducing signaling complex activity and apoptosis of human acute leukemia cells. *Cancer Res*, 2004, 7:2580-2589

Grignani F, Matteis S, Nervi C, Tomassoni L, Gelmetti V, Ciocce M, Fanelli M, Ruthardt M, Ferrara FF, Zamir I, Seiser C, Grignani F, Lazar MA, Minucci S, Pelicci PG: Fusion protein of retinoic acid receptor-alpha recruits histone deacetylases in promyelocytic leukaemia. *Nature*, 1998, 391:815-818

- Hanahan D, Weinberg RA: The hallmarks of cancer. *Cell*, 2000, 100:57-70
- Havell EA, Fiers W, North RJ: The antitumor function of tumor necrosis factor (TNF) I. Therapeutic action of TNF against an established murine sarkoma is indirect, immunologically dependent, and limited by severe toxicity. *J Exp Med*, 1998, 167:1067-1085
- He LZ, Guidez F, Tribioli C, Peruzzi D, Ruthardt M, Zelent A, Pandolfi PP: Distinct interactions of PML-RARalpha and PLZF-RARalpha with corepressors determine differential responses to RA in APL. *Nat Genet*, 1998,18: 126–135
- Heibert SW, Lutterbach B, Durst K, Wang L, Linggi B, Wu S, Wood L, Amann J, King D, Hou Y: Mechanisms of transcriptional repression by the t(8;21)-, t(12;21)-, and inv(16)-encoded fusion proteins. *Cancer Chemother Pharmacol*, 2001, 48: S31–S34
- Henderson C, Mizzau M, Paroni G, Maestro R, Schneider C, Brancolini C: Role of caspases, bid, and p53 in the apoptotic response triggered by histone deacetylase inhibitors trichostatin-A (TSA) suberoylanilide hydroxamic acid and (SAHA). *J Biol Chem*, 2003, 278 (14): 12579-12589
- Hernandez A, Thomas R, Smith F, Sandberg J, Kim S, Chung DH, Evers BM: Butyrate sensitizes human colon cancer cells to TRAIL-mediated apoptosis. *Surgery*, 2001, 130: 265-272
- Herold C, Ganslmayer M, Ocker M, Hermann M, Geerts A, Hahn EG, Schuppan D: The histone-deacetylase inhibitor Trichostatin A blocks proliferation and triggers apoptotic programs in hepatoma cells. *J Hepatol*, 2002, 36:233-240
- Huynh KD, Fischle W, Verdin E, Bardwell VJ: BCoR, A novel corepressor involved in BCL-6 repression. *Genes Dev*, 2000, 14:1810–1823
- Inoue H, Shiraki K, Ohmori S, Sakai T, Deguchi M, Yamanaka T, Okano H, Nakano T: Histone deacetylase inhibitors sensitize human colonic adenocarcinoma cell lines to TNF-related apoptosis inducing ligand-mediated apoptosis. *Int J Mol Med*, 2002, 9: 521-525
- Insinga A, Monestiroli S, Ronzoni S, Gelmetti V, Marchesi F, Viale A, Altucci L, Nervi C, Minucci S, Pelicci PG: Inhibitors of histone deacetylases induce tumor-selective apoptosis through activation of death receptor pathway. *Nat Med*, 2005, 11:71-76
- Iyer NG, Ozdag H, Caldas C: p300/CBP and cancer. *Oncogene*, 2004, 23: 4225-4231
- Jacobson S, Pillus L: Modifying chromatin and concepts of cancer. *Curr Opin Genet Dev*, 1999, 9:175-184

Jenuwein T, Allis CD: Translating the histone code. *Science*, 2001, 293:1074-1080

Jo M, Kim TH, Seol DW, Esplen JE, Dorko K, Billiar TR, Strom SC: Apoptosis induced in normal human hepatocytes by tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand. *Nat Med*, 2000, 6:564–567

Johnstone RW: Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nat Rev Drug Discov*, 2002, 1:287-299

Johnstone RW, Licht JD: Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy: is transcription the primary target? *Cancer Cell*, 2003, 4:13-18

Kelley SK, Ashkenazi A: Targeting death receptors in cancer with Apo2L/TRAIL. *Curr Opin Pharmacol*, 2004, 4:333-339

Kijima M, Yoshida M, Sugita K, Horinouchi S, Beppu T: Trapoxin, an antitumor cyclic tetrapeptide, is an irreversible inhibitor of mammalian histone deacetylase. *J Biol Chem*, 1993, 268:22429-22435

Kim K, Fisher MJ, Xu SQ, El-Deiry WS: Molecular determinants of response to TRAIL in killing normal and cancer cells. *Clin Cancer Res*, 2000, 6:335-346

Kim MS, Kwon HJ, Lee YM, Baek JH, Jang JE, Lee SW, Moon EJ, Kim HS, Lee SK, Chung HY, Kim CW, Kim KW: Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes. *Nat Med*, 2001, 7:437-443

Kim MS, Blake M, Baek JH, Kohlhagen G, Pommier Y, Carrier F: Inhibition of histone deacetylase increases cytotoxicity to anticancer drugs targeting DNA. *Cancer Res*, 2003, 63:7291-7300

Kim YB, Ki SW, Yoshida M, Horinouchi S: Mechanism of cell cycle arrest caused by histone deacetylase inhibitors in human carcinoma cells. *J Antibiot (Tokyo)*, 2000, 53:1191-1200

Kim YS, Schwabe RF, Qian T, Lemasters JJ, Brenner DA: TRAIL-mediated apoptosis requires NF-kappaB inhibition and the mitochondrial permeability transition in human hepatoma cells. *Hepatology*, 2002, 36:1498-1508

Kornberg, R D: Structure of chromatin. *Annu Rev Biochem*, 1977, 46: 931-954

Kouzasdes T: Histone acetylases and deacetylases in cell proliferation. *Curr Opin Genet Dev*, 1999, 9:40-48

Kramer OH, Gottlicher M, Heinzl T: Histone deacetylase as a therapeutic target. *Trends Endocrinol Metab*, 2001, 12:294-300

Lacour S, Hammann A, Wotawa A, Corcos L, Solary E, Dimanche-Boitrel MT: Antitumor agent sensitize tumor cells to tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand mediated caspase-8 activation and apoptosis. *Cancer Res*, 2001, 61:1645-1651

Lawrence D, Shahrokh Z, Marsters S, Achilles K, Shih D, Mounho B, Hillan K, Totpal K, DeForge L, Schow P, Hooley J, Sherwood S, Pai R, Leung S, Khan L, Gliniak B, Bussiere J, Smith CA, Strom SS, Kelley S, Fox JA, Thomas D, Ashkenazi A: Differential hepatocyte toxicity of recombinant Apo2L/TRAIL versions. *Nat Med*, 2001, 7:383-385

LeBlanc H, Lawrence D, Varfolomeev E, Totpal K, Morlan J, Schow P, Fong S, Schwall R, Sinicropi D, Ashkenazi A: Tumor-cell resistance to death receptor-induced apoptosis through mutational inactivation of the proapoptotic Bcl-2 homolog Bax. *Nat Med*, 2002, 8:274-281

Legube G, Trouche D. Regulating histone acetyltransferases and deacetylases. *EMBO Rep* 2003;4:944-947

Licht JD: AML1 and the AML1-ETO fusion protein in the pathogenesis of t(8;21) AML. *Oncogene*, 2001, 20:5660-5679

Lin RJ, Nagy L, Inoue S, Shao W, Miller WH Jr, Evans RM: Role of the histone deacetylase complex in acute promyelocytic leukaemia. *Nature*, 1998, 391:811-814

Lin RJ, Sternsdor T, Tini M, Evans RM: Transcriptional regulation in acute promyelocytic leukaemia. *Oncogene*, 2001, 20:7204-7215

Lindemann RK, Gabrielli B, Johnstone RW: Histone deacetylase inhibitors for the treatment of cancer. *Cell cycle*, 2004, 6: 779-788

Llovet JM, Burroughs A, Bruix J: Hepatocellular carcinoma. *Lancet*, 2003, 362:1907-1917

Llovet JM, Bruix J: Systematic review of randomized trials for unresectable hepatocellular carcinoma: Chemoembolization improves survival. *Hepatology* 2003, 37:429-442

Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ: Crystal structure of the nucleosome core particle at 2,8 Å resolution. *Nature*. 1998, 389:251-260

Maeda T, Towatari M, Kosugi H, Saito H: Upregulation of costimulatory /adhesion molecules by histone deacetylase inhibitors in acute myeloid leukemia cells. *Blood*, 2000, 96:3847-3856

MacLachlan TK, Sang N, Giordano A: Cyclins, cyclin-dependent kinases and cdk-inhibitors: Implications in cell cycle control and cancer. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*, 1995, 5:127-156

Magner WJ, Kazim AL, Stewart C, Romano MA, Catalano G, Grande C, Keiser N, Santaniello F, Tomasi TB: Activation of MHC class I, II and CD40 gene expression by histone deacetylase inhibitors. *J Immunol*, 2000, 165:7017-7024

Marmorstein R, Roth, SY: Histone acetyltransferases: funktion, structure and catalysis. *Curr Opin Genet Dev*, 2001, 11:155-161

Marks PA, Richon VM, Rifkind RA: Histone Deacetylase Inhibitors: Inducers of Differentiation or Apoptosis of Transformed Cells. *JNCI Cancer Spectrum*, 2000, 92:1210-1216

Muller C, Leutz A: Chromatin remodelling in development and differentiation. *Curr Opin Genet Dev*, 2001, 11:167-174

Nagane M, Pan G, Weddle JJ, Dixit VM, Cavenee WK, Huang HJ: Increased death receptor 5 expression by chemotherapeutic agents in human gliomas causes synergistic cytotoxicity with tumor necrosis factor-related apoptosis inducing ligand in vitro and in vivo. *Cancer Res*, 2000, 60:847-853

Nakabayashi H, Taketa K, Miyano K, Yamane T, Sato J: Growth of human hepatoma cells lines with differentiated functions in chemically defined medium. *Cancer Res*, 1982, 9:3858-3863

Nakata S, Yoshida T, Horinaka M, Shiraishi T, Wakada M, Sakai T: Histone deacetylase inhibitors upregulate death receptor 5/TRAIL-R2 and sensitize apoptosis induced by TRAIL/APO2-L in human malignant tumor cells. *Oncogene*, 2004, 37:6261-6271

Nebbio A, Clarke N, Voltz E, Germain E, Ambrosino C, Bontempo P, Alvarez R, Schiavone EM, Ferrara F, Bresciani F, Weisz A, De Lera AR, Gronemeyer Hinrich, Altucci L. Tumor-selective action of HDAC inhibitors involves TRAIL induction in acute myeloid leukaemia cells. *Nat Med*, 2005, 11:77-84

Newmark HL, Lupton JR, Young CW: Butyrate as a differentiating agent: pharmacokinetics, analogues and current status. *Cancer Lett*, 1994, 78:1-5

Ng HH, Bird A: Histone deacetylases : silencers for hire. *Trends Biochem Sci*, 2000, 25:121-126

Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C: A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods*, 1991, 2:271-279

Norton VG, Imai BS, Yau P, Bradburry EM: Histone acetylation reduces nucleosome core particle linking number change. *Cell*, 1989, 57:449-457

Ogasawara J, Watanabe-Fukunaga R, Adachi M, Matsuzawa A, Kasugai T, Kitamura Y, Itoh N, Suda T, Nagata S: Lethal effect of the anti-Fas antibody in mice. *Nature*, 1993, 364:806-809

Okano H, Shiraki K, Inoue H, Kawakita T, Yamanaka T, Deguchi M, Sugimoto K, Sakai T, Ohmori S, Fujikawa K, Murata K, Nakano T: Cellular FLICE/caspase-8-inhibitory protein as a principal regulator of cell death and survival in human hepatocellular carcinoma. *Lab Invest*, 2003, 83:1033-1043

Ordentlich P, Downes M, Evans RM: Corepressors and nuclear hormone receptor function. *Curr Top Microbiol Immunol*, 2001, 254:101-116

Pan G, Ni J, Wei YF, Yu G, Gentz R, Dixit VM: An antagonist decoy receptor and a death domain-containing receptor for TRAIL. *Science*, 1997, 277:815-818

Pandolfi PP: Transcription therapy for cancer. *Oncogene*, 2001, 20:3116-3127

Papeleu P, Loyer P, Vanhaecke T, Elaut G, Geerts A, Guguen-Guillouzo C, Rogiers V: Trichostatin A induces differential cell cycle arrests but does not induce apoptosis in primary cultures of mitogen-stimulated rat hepatocytes. *J Hepatol*, 2003, 39:374-382

Peart MJ, Smyth GK, van Laar RK, Bowtell DD, Richon VM, Marks PA, Holloway AJ, Johnstone RW: Identification and functional significance of genes regulated by structurally different histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2005, 10:3697-3702

Phiel CJ, Zhang F, Huang EY, Guenther MG, Lazar MA, Klein PS: Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *J Biol Chem*, 2001, 276:36734-36741

Piekarz RL, Robey R, Sandor V, Bakke S, Wilson WH, Dahmouch L, Kingma DM, Turner ML, Altemus R, Bates SE: Inhibitor of histone deacetylation, depsipeptide (FR901228), in the treatment of peripheral and cutaneous T-cell lymphoma: a case report. *Blood*, 2001, 98:2865-2868

Pitti RM, Marsters SA, Ruppert S, Donahue CJ, Moore A, Ashkenazi A: Induction of apoptosis by Apo-2 ligand, a new member of the tumor necrosis factor cytokine family. *J Biol Chem*, 1996, 271:12687-12690

Pogo BG, Allfrey VG, Mirsky AE: RNA synthesis and histone acetylation during the course of gene activation in lymphocytes. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1966, 55:805-812

Qiu L, Burgess A, Fairlie DP, Leonard H, Parsons PG, Gabrielli BG: Histone deacetylase inhibitors trigger a G2 checkpoint in normal cells that is defective in tumor cells. *Mol Biol Cell*, 2000, 11:2069-2083

Richon VM, Emiliani S, Verdin E, Webb Y, Breslow R, Rifkind RA, Marks PA: A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1998, 95:3003-3007

Richon VM, Sandhoff TW, Rifkind RA, Marks PA: Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation. *Proc Natl Acad Sci USA*, 2000, 97:10014-10019

Rosato R, Wang Z, Gopalkrishnan RV, Fisher PB, Grant S: Evidence of a functional role for the cyclin-dependent kinase inhibitor p21WAF1/CIP1/MDA6 in promoting differentiation and preventing mitochondrial dysfunction and apoptosis induced by sodium butyrate in human myelomonocytic leukemia cells (U937). *Int J Oncol*, 2001, 19:181-191

Ruefli AA, Ausserlechner MJ, Bernhard D, Sutton VR, Tainton KM, Kofler R, Smyth MJ, Johnstone RW: 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 USA*, 2001, 98:10833-10838

Saito A, Yamashita T, Mariko Y, Nosaka Y, Tsuchiya K, Ando T, Suzuki T, Tsuruo T, Nakanishi O: A synthetic inhibitor of histone deacetylase, MS-27-275, with marked in vivo antitumor activity in human tumors. *Proc Natl Acad Sci USA*, 1999, 96:4592-4597

Sandor V, Senderowicz A, Mertins S, Sackett D, Sausville E, Blagosklonny MV, Bates SE: p21-Dependent G1 arrest with downregulation of cyclin D and upregulation of cyclin E by the histone deacetylase inhibitor FR901228. *Br J Cancer*, 2000, 83:817-825

Simonetti RG, Liberati A, Angiolini C, Pagliaro L: Treatment of hepatocellular carcinoma: a systematic review of randomized controlled trials. *Ann Oncol*, 1997, 8:117-136

Shin EC, Seong YR, Kim CH, Kim H, Ahn YS, Kim K, Kim SJ, Hong SS, Park JH: Human hepatocellular carcinoma cells resist to TRAIL-induced apoptosis, and the resistance is abolished by cisplatin. *Exp Mol Med*, 2002, 2:114-122

Skehan P, Storeng R, Scudiero D, Monks A, McMahon J, Vistica D, Warren JT, Bokesch H, Kenney S, Boyd MR: New colorimetric cytotoxicity assay for anticancerdrug screening. *J Natl Cancer Inst*, 1990, 82:1107-1112

Strahl BD, Allis CD: The language of covalent histone modifications. *Nature*, 2000, 403:41-45

Svechnikova I, Gray SG, Kundrotiene J, Ponthan F, Kogner P, Ekstrom TJ: Apoptosis and tumor remission in liver tumor xenografts by 4-phenylbutyrate. *Int J Oncol*, 2003, 22:579-588

Takehara T, Liu X, Fujimoto J, Friedman SL, Takahashi H: Expression and role of Bcl-XL in human hepatocellular carcinomas. *Hepatology*, 2001, 34:55-61

Thasler WE, Weiss TS, Schillhorn K, Stoll PT, Irrgang B, Jauch KW: Charitable state-controlled foundation human tissue and cell research: Ethic and legal aspects in the supply of surgically removed human tissue for research in the academic and commercial sector in Germany. *Cell Tissue Bank*, 2003, 1:49-56

Tsuji N, Kobayashi M, Nagashima K, Wakisaki Y, Koizumi K: A new antifungal antibiotic, trichostatin. *J Antibiot (Tokyo)*, 1976, 29:1-6

Van Lint C, Emiliani S, Verdin E: The expression of a small fraction of cellular gene is changed in response to histone hyperacetylation. *Gene Expr*, 1996, 5:245-4

Vaziri C, Stice L, Faller DV: Butyrate-induced G1 arrest results from p21-independent disruption of retinoblastoma protein-mediated signals. *Cell Growth Differ*, 1998, 9:465-474

Vrana JA, Decker RH, Johnson CR, Wang Z, Jarvis WD, Richon VM, Ehinger M, Fisher PB, Grant S: Induction of apoptosis in U937 human leukemia cells by suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) proceeds through pathways that are regulated by Bcl-2/Bcl-XL, c-JUN and p21CIP1, but independent of p53. *Oncogene*, 1999, 18:7016-7025

Walczak H, Miller RE, Ariail K, Gliniak B, Griffith TS, Kubin M, Chin W, Jones J, Woodward A, Le T, Smith C, Smolak P, Goodwin RG, Rauch CT, Schuh JC, Lynch DH: Tumoricidal activity of tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand in vivo. *Nat Med*, 1999, 5:157-163

Warrell RP Jr: Therapeutic targeting of transcription in acute promyelocytic leukemia by use of an inhibitor of histone deacetylase. *J Natl Cancer Inst*, 1998, 90:1621-1625

Wei MC, Zong WX, Cheng EH, Lindsten T, Panoutsakopoulou V, Ross AJ, Roth KA, MacGregor GR, Thompson CB, Korsmeyer SJ: Proapoptotic BAX and BAK: a requisite gateway to mitochondrial dysfunction and death. *Science*, 2001, 292:727-730

Weiss TS, Pahernik S, Scheruebl I, Jauch KW, Thasler WE: Cellular damage to human hepatocytes through repeated application of 5-aminolevulinic acid. *J Hepatol*, 2003, 38:476-482

Wu J, Grunstein M: 25 Years after the chromosome model: chromatin modifications. *Trends Biochem Sci*, 2000, 25:619-623

Workman JL, Kingston RE: Alteration of nucleosome structure as a mechanism of transcriptional regulation. *Annu Rev Biochem*, 1998, 67:545-579

Yagita H, Takeda K, Hayakawa Y, Smyth MJ, Okumura K: TRAIL and its receptors as targets for cancer therapy. *Cancer Sci*, 2004, 10:777-783

Yamashita Y, Shimada M, Harimoto N, Rikimaru T, Shirabe K, Tanaka S, Sugimachi K: Histone deacetylase inhibitor trichostatin A induces cell-cycle arrest/apoptosis and hepatocyte differentiation in human hepatoma cells. *Int J Cancer*, 2003, 103:572-576

Yoshida M, Kijijama M, Akita M, Beppu T: Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J Biol Chem*, 1990, 265:17174-17179

Zelent A, Guidez F, Melnick A, Waxman S, Licht JD: Translocations of the RAR α gene in acute promyelocytic leukemia. *Oncogene*, 2001, 20:7186-7203

Zhu P, Martin E, Mengwasser J, Schlag P, Janssen KP, Göttlicher M: Induction of HDAC2 expression upon loss of APC in colorectal tumorigenesis. *Cancer Cell*, 2004, 5:455-463

Zhu P, Martin E, Mengwasser J, Schlag P, Janssen KP, Göttlicher M: Induction of HDAC2 expression upon loss of APC in colorectal tumorigenesis. *Cancer Cell*, 2004, 5:455-463

Teile dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

S. Armeanu, **A. Pathil**, S. Venturelli, P. Mascagni, T.S. Weiss, M. Göttlicher, M. Gregor, U.M. Lauer, M. Bitzer: Apoptosis on hepatoma cells but not on primary hepatocytes by histone deacetylase inhibitors valproate and ITF2357. *J Hepatol*, 2005; 42:210-217

A. Pathil, S. Armeanu, S. Venturelli, P. Mascagni, T.S. Weiss, M. Gregor, U.M. Lauer, M. Bitzer: HDAC inhibitor treatment of hepatoma cells induces both TRAIL-independent apoptosis & restoration of sensitivity to TRAIL. *Hepatology*, 2006; 43:425-434

Zitierbare Veröffentlichungen:

A. Pathil , S. Armeanu, S. Venturelli, T. Weiss, M. Gregor, U.M. Lauer, M. Bitzer: Differentielle Regulation von FLIP durch Histondeacetylase-Inhibitoren führen zu einer selektiven Sensibilisierung humaner Hepatomzellen gegenüber TRAIL. *Z Gastroenterol*, 2005; 43:882-883

Nicht-zitierbare Veröffentlichungen (Poster):

A. Pathil, S. Armeanu, S. Venturelli, M. Gregor, U.M. Lauer, M. Bitzer: Molekulare Wirkmechanismen der Hyperacetylierung von Histonproteinen als Therapieprinzip beim Hepatozellulären Karzinom. Kongress 20. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber 2004, Freiburg

A. Pathil, M. Bitzer, S. Venturelli, M. Gregor, U.M. Lauer, S. Armeanu: Sensibilisierung humaner Hepatomzellen gegenüber TRAIL durch

Histondeacetylase-Inhibition. Kongress 20. Jahrestagung der Deutschen Arbeitsgemeinschaft zum Studium der Leber 2004, Freiburg

A. Pathil, S. Armeanu, S. Venturelli, P. Mascagni, T.S. Weiss, M. Gregor, U.M. Lauer, M. Bitzer: TRAIL-Sensibilisierung durch Modulation des zellulären Proteins FLIP mit Hilfe von Histondeacetylase-Inhibitoren als neue Therapieoption beim Hepatozellulären Karzinom. 42. Kongress der Südwestdeutschen Gesellschaft für Innere Medizin 2005, Stuttgart

Danksagung

Mein ganz herzlicher Dank gilt all denjenigen, die diese Arbeit möglich gemacht und mit Rat und Tat zu ihrem Gelingen beigetragen haben.

Bei Herrn PD Dr. U. M. Lauer möchte ich mich für die Überlassung meines Dissertationsthemas und die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe bedanken.

Herrn PD Dr. M. Bitzer danke ich ganz herzlich für die zu jeder Zeit hervorragende und motivierende Betreuung meiner Arbeit, die sich durch stete Diskussionsbereitschaft, spürbare Begeisterung und Engagement für dieses Projekt auszeichnete.

Auch Herrn Dr. S. Armeanu gilt mein Dank für die äußerst kompetente und intensive Betreuung meiner Arbeit im Labor. Seine Geduld und Hilfsbereitschaft bei Problemen und Fragen, sowie zahlreiche Anregungen und Diskussionen haben zum entscheidend Gelingen dieser Arbeit beigetragen.

Allen Kollegen der Arbeitsgruppe danke ich für das gute Arbeitsklima, ein besonderer Dank geht hierbei an Frau I. Smirnow, welche mich bei meiner Arbeit tatkräftig unterstützt hat.

Weiterhin bedanke ich mich für die finanziellen Unterstützung dieser Doktorarbeit durch das Promotionsstipendium des DFG-Graduiertenkollegs 686-1 „Mechanismen der Entstehung solider Tumoren und experimenteller Therapiekonzepte“.

Ein besonderer Dank geht an Arne, für seinen liebevollen Zuspruch und seine tatkräftige Unterstützung und an meine Eltern, die mir das Studium ermöglicht und mich stets unterstützt haben.

Curriculum vitae

Persönliche Daten

Name Anita Pathil-Warth
geboren am 24.09.1981
in Stuttgart
Eltern Selin und George Pathil
Familienstand verheiratet

Schulzeit

1989 – 1991 Lerchenrain-Grundschule, Stuttgart
1991 – 2000 Schickhardt-Gymnasium, Stuttgart
06/2000 Allgemeine Hochschulreife

Studium

Ab 10/2000 Studium der Humanmedizin an der Eberhard-Karls-
Universität Tübingen
09/2002 Ärztliche Vorprüfung
10/2002 – 03/2006 Promotion in der Medizinischen Klinik der Universitätsklinik
Tübingen, Abteilung I,
Arbeitsgruppe von Prof. Dr. Lauer/PD. Dr. Bitzer
08/2003 1. Staatsexamen
08/2005 2. Staatsexamen
10/2005 1. PJ-Tertial: Pädiatrie, Kinderklinik, UKT Tübingen
02/2006 2. PJ-Tertial: Innere Medizin, Med. Klinik, UKT Tübingen
06/2006 3. PJ-Tertial: Chirurgie, Kantonsspital Graubünden, Chur
09.11.2006 3. Staatsexamen

Stipendien/Preise

02/2002 – 11/2006 Stipendiatin der Studienstiftung des Deutschen Volkes
10/2002 – 10/2003 Promotionsstipendium des DFG-Graduiertenkollegs 686-1
„Mechanismen der Entstehung solider Tumoren und
experimenteller Therapiekonzepte“
10/2005 Posterpreis, 42. Kongress der Südwestdeutschen
Gesellschaft für Innere Medizin in Stuttgart
03/2006 AIO-Wissenschaftspreis 2006 der Deutschen
Krebsgesellschaft
10/2006 Carl-Liebermeister-Preis 2006 der Universität Tübingen