

Aus der Universitätsklinik für Kinder- und Jugendmedizin Tübingen
Abteilung für Kinderchirurgie und Kinderurologie mit Poliklinik
Ärztlicher Direktor: Professor Dr. J. Fuchs

Evaluation von Kinase-Inhibitoren zur Behandlung des Hepatoblastoms

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der Medizinischen Fakultät
der Eberhard Karls Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Timo Felix Wonner
aus
Stuttgart

2013

Dekan: Professor Dr. I. B. Autenrieth

1. Berichterstatter: Professor Dr. S. Armeanu-Ebinger

2. Berichterstatter: Privatdozent Dr. M. Schenk

Inhaltsverzeichnis

1	EINLEITUNG	1
1.1	Das Hepatoblastom	1
1.2	Pathophysiologie	1
1.3	Klinik und Diagnose	2
1.4	Tumorstagingssysteme	3
1.5	Therapie	4
1.6	Zielgerichtete molekulare Krebstherapie	6
1.6.1	Die Wee1-Kinasen und der Wee1-InhibitorII	7
1.6.2	Der Membranrezeptor MET und SU11274	8
1.6.3	Die Aurorakinasen und der Aurorakinase-Inhibitor VX-680	9
1.7	Der Histon-Deacetylase-Inhibitor Vorinostat (SAHA)	11
1.8	Ziele dieser Arbeit	12
2	MATERIAL & METHODEN	13
2.1	Materialien	13
2.1.1	Chemikalien	13
2.1.2	Kits (Reagenziensysteme)	15
2.1.3	Lösungen und Puffer	15
2.1.4	Zellkulturen und Medien	18
2.1.5	Antikörper	19
2.1.6	Geräte und Hilfsmittel	20
2.1.7	Verbrauchsmaterialien	21
2.1.8	Computerprogramme	22
2.2	Methoden	23
2.2.1	Zelllinien	23
2.2.2	Zellkultur	25
2.2.3	Verwendete Substanzen	26
2.2.4	Viabilitätsbestimmung	28
2.2.5	Western Blot	30
2.2.6	Apoptosebestimmung mittels NucView Caspase-3 Detektion	34
2.2.7	Durchflusszytometrie	35
2.2.8	Immunhistochemische Untersuchung	38
2.2.9	Immunfluoreszenzfärbung	40

3	ERGEBNISSE	42
3.1	Wirkung von Kinase-Inhibitoren auf die Viabilität von HB-Zellen	42
3.1.1	Einfluss von VX-680, Wee1-InhibitorII und SU11274 auf die Proliferation von HB-Zellen.....	42
3.1.2	Einfluss von Wee1-InhibitorII in Kombination mit CDDP auf die Proliferation von HB-Zellen	43
3.1.3	Einfluss von VX-680 in Kombination mit CDDP auf die Proliferation von HB-Zellen	45
3.1.4	Einfluss von VX-680 und SAHA auf die Proliferation von HB-Zellen.....	46
3.2	Morphologische Veränderungen von HB-Zellen unter Behandlung von VX-680 und SAHA	48
3.3	Apoptoseinduktion von VX-680 und SAHA in HB-Zellen	51
3.4	Einfluss von VX-680 und SAHA auf die Phosphorylierung und Acetylierung von Histon H3-Proteinen in HB-Zellen	54
3.4.1	Veränderung der Phosphorylierung in der Immunfluoreszenzdarstellung.....	54
3.4.2	Veränderung der Phosphorylierung in der FACS-Analyse	56
3.4.3	Veränderung von Phosphorylierung und Acetylierung von Histon H3-Proteinen im Western Blot.	57
3.5	Histonmodifikation in HB-Gewebe	61
3.6	Veränderung der Expression von Tumorstammzellmarkern unter Behandlung mit VX-680 und SAHA	64
3.7	Wirkung von VX-680 und SAHA auf Sphäroide	66
4	DISKUSSION	69
4.1	Inhibition von Wee1- und MET-Kinasen in HB-Zellen	69
4.2	Inhibition von Aurorakinasen in HB-Zellen	70
4.3	Auswirkung von Phosphorylierung und Acetylierung von Histonproteinen in HB-Zellen	74
4.4	Wirkung von VX-680 auf „Multidrug“-resistente HB-Zellen	76
5	AUSBLICK	77
6	ZUSAMMENFASSUNG	78
7	LITERATURVERZEICHNIS	79
8	ABKÜRZUNGEN	84
9	DANKSAGUNG	88

Ergebnisse dieser Arbeit wurden veröffentlicht in:

In vitro evaluation of the Aurora kinase inhibitor VX-680 for Hepatoblastoma.

Dewerth A, Wonner T, Lieber J, Ellerkamp V, Warmann SW, Fuchs J, Armeanu-Ebinger S.

Pediatr Surg Int. 2012 Jun;28(6):579-89. Epub 2012 Apr 18.

1 Einleitung

1.1 Das Hepatoblastom

Das Hepatoblastom (HB) ist der häufigste Lebertumor bei Kindern und nimmt ca. 1 % aller malignen Tumore des Kindesalters ein [1]. Der Tumor tritt meist bei Patienten unter 3 Jahren auf, wobei das durchschnittliche Alter bei der Erstdiagnose 1 Jahr beträgt. Die Prognose des HBs ist altersabhängig und bei älteren Kindern oder Erwachsenen deutlich schlechter. Jungen sind typischerweise häufiger betroffen als Mädchen, wobei die männliche Prädisposition bei 1,6-3,3 zu 1 liegt [2]. Es kommt bei den meisten Patienten zu einer Erhöhung der Konzentration des Serum- α -Fetoproteins (AFP). Zu den Hauptsymptomen gehört zudem eine vergrößerte Leber und Abdominalschmerzen [3]. Es gibt Hinweise darauf, dass Patienten mit Beckwith-Wiedemann-Syndrom und „Familiärer adenomatöser Polyposis“ (FAP) eine Präposition bezüglich der Entwicklung eines HBs aufweisen [4-6]. HBs treten in der Regel unifokal auf, wobei der rechte Leberlappen häufiger betroffen ist als der linke [7, 8]. Die Behandlung des HBs erfolgt üblicherweise in einer Kombination aus Chemotherapie und der kompletten chirurgischen Entfernung des Tumorgewebes. In Europa erfolgt vor der chirurgischen Resektion des Tumors eine neoadjuvante Chemotherapie, gefolgt von einer kurzen adjuvanten Chemotherapie. In den USA hingegen wird das Tumorgewebe wenn möglich zuerst chirurgisch entfernt und anschließend eine adjuvante Chemotherapie durchgeführt [9, 10].

1.2 Pathophysiologie

Hepatoblastome setzen sich aus Zellen zusammen, die unreifen Lebervorläuferzellen gleichen, und werden daher als embryonaler Tumor klassifiziert [11]. Die Tumormasse des HBs besteht sowohl aus mesenchymal als auch aus embryonal differenzierten Zellen, was auf eine pluripotente Stammzellgenese hindeutet [12, 13]. Histologisch tritt das HB entweder als

epithelialer Typ (56 %) mit rein fetalem und fetal/embryonalem Phänotyp oder als gemischter epithelial/mesenchymaler Typ (44 %) auf [14]. Typischerweise ist das HB nicht mit einer Zirrhose assoziiert. Die komplette Pathophysiologie des HBs konnte noch nicht endgültig abgeklärt werden, jedoch weist die bisherige Datenlage darauf hin, dass unterschiedliche Pathomechanismen der Genese des HBs zugrundeliegen. Daten legen die Vermutung nahe, dass es bei Hepatoblastomen, die mit dem Beckwith-Wiedemann-Syndrom assoziiert sind, zu einem Verlust der Heterogenität von Chromosom 11p kommt [15]. In mehreren Studien konnte gezeigt werden, dass in FAP assoziierten Hepatoblastomen Mutationen im APC Gen und Mutationen im β -Catenin Gen eine wichtige Rolle in der Pathogenese des HBs spielen [16, 17]. Bei sporadisch auftretenden Hepatoblastomen konnten bei 67 % der Tumoren Mutationen im β -Catenin Gen gefunden werden [18]. Weitere häufig gefundene genetische Aberrationen sind Amplifikationen der Chromosomen bzw. Chromosomenarme 2, 8q, 4q und 20 sowie Mutationen im Axin-Gen und im „Hedgehog Pathway“ [19-22].

1.3 Klinik und Diagnose

Die meisten Patienten fallen durch ein aufgeblähtes Abdomen mit einer Resistenz im rechten Unterbauch auf [3]. Der rechte Leberlappen ist dreimal häufiger befallen als der linke, bei 20-30 % der Patienten tritt ein bilobulärer und bei ca.15 % ein multizentrischer Befall auf. Die Patienten leiden zumeist unter Schmerzen, Leberschwellung und Gewichtsverlust. Während die Serumspiegel für Bilirubin und Leberenzyme in der Regel normal sind, kommt es in etwa bei 80 % der Fälle zu einer Erhöhung des AFP, differenzialdiagnostisch ist dieser Marker insbesondere bei Neugeborenen zur Abgrenzung des HBs von der Leberhämangiomatose und dem Hämangioendotheliom wichtig [7, 8]. Obwohl es keine eindeutige Korrelation zwischen dem AFP-Spiegel und dem Outcome gibt, zeichnet sich doch die Tendenz ab, dass Patienten mit sehr niedrigen (< 100 ng/ml) und sehr hohen (> 1000000 ng/ml) AFP-Plasmaspiegeln eine schlechtere Prognose aufweisen als Patienten mit intermediären Werten. Durch

die zusätzlich bestehende Korrelation zwischen dem Ausmaß der Erkrankung und dem AFP-Spiegel stellt AFP einen wichtigen Verlaufsparemeter dar [23]. Neben der körperlichen Untersuchung und den Laborparametern ist die Bildgebung mittels MRT, CT und Ultraschall ein wichtiger diagnostischer und prognostischer Faktor, die zudem eine zentrale Rolle bei der Stadieneinteilung des Tumors spielt.

1.4 Tumorstagingssysteme

Die klinische Stadieneinteilung des HBs ist derzeit noch uneinheitlich. Das in den USA und Deutschland gebräuchlichste System beinhaltet vier postchirurgische Stadien, die sich nach einer initialen Laparotomie oder nach der bildgebenden Diagnostik richten.

Tab. 1: Stadieneinteilung der Deutschen Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie (GPOH) [24]

Stadium	Definition
I	vollständig resezierter Tumor (R0-Resektion)
II	primär resezierter Tumor, mikroskopischer Rest (R1-Resektion)
III	makroskopischer Resttumor (R2-Resektion) und/oder Lymphknotenbefall und/oder Ruptur mit Tumorspilling
IV	Tumor mit Fernmetastase

Die Internationale Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie (SIOP) hat für ihre Lebertumorstudie SIOPEL1 ein eigenes System der Einteilung entwickelt. Das präoperative Tumorstagingssystem PRETEXT (engl. Pretreatment extent of disease) teilt den Tumor nach präoperativen Befunden der Bildgebung (obligat: Kernspintomographie, ergänzend: Computertomographie, Ultraschall) in 4 verschiedene Stadien ein. Die vier Gruppen richten sich nach der Anzahl der infiltrierten Sektoren nach der Aufteilung der Leber in vier „chirurgische“ Abschnitte. Diese Einteilung ermöglicht eine präoperative Stadieneinteilung, um unter anderem die bestmögliche Therapie zu bestimmen.

Tab. 2: Stadieneinteilung nach PRETEXT [25]

Stadium	Definition
I	Tumor befällt einen Sektor, 3 Sektoren sind frei
II	Tumor befällt 2 Sektoren, 2 zusammenhängende Sektoren sind frei
III	Tumor befällt 3 Sektoren oder 2 nicht zusammenhängende Sektoren, 1 Sektor oder 2 nicht zusammenhängende Sektoren sind frei
IV	Tumor befällt alle 4 Sektoren, kein Sektor ist frei.

Das System der GPOH korreliert zwar hochsignifikant mit dem tumorfreien Überleben, doch aufgrund der guten Reproduzierbarkeit, der prognostischen Relevanz und wegen der geringeren Abhängigkeit vom Untersucher haben sich amerikanische und europäische Studiengruppen geeinigt, neben den national gebräuchlichen Systemen auch das präoperative Tumoreinteilungssystem PRETEXT anzuwenden [3, 25]. Daher werden auch alle HB-Patienten, die im Rahmen einer Studie behandelt werden, nach dem PRETEXT System eingestuft [25].

1.5 Therapie

Die chirurgische Resektion des HBs gilt nach derzeitigem Wissensstand als essentiell, um das Überleben des Patienten zu ermöglichen. Eine primäre Resektion ist jedoch nur bei kleinen Tumoren indiziert, die nicht metastasiert sind, sich sicher auf einen Leberlappen beschränken und somit der PRETEXT Gruppe I und II zuzuordnen sind [9, 10]. Erscheint ein Tumor mit diesem Operationsverfahren nicht sicher resektabel oder kann kein Sicherheitsabstand von mindestens 1 cm eingehalten werden, erfolgt immer eine neoadjuvante Chemotherapie. Generell werden Hepatoblastome nach den heutigen Therapieprotokollen in eine Standardrisiko (SR)- und eine Hochrisiko (HR)-Gruppe eingeteilt. SR-Hepatoblastome können den PRETEXT Gruppen I, II oder III zugeordnet werden, d. h. sie sind eindeutig auf die Leber beschränkt

und es sind nicht alle vier chirurgischen Sektoren befallen. Es fallen somit solche Tumore in diese Gruppe, die potentiell nach einer Chemotherapie vollständig entfernt werden können [10, 26]. Zur Gruppe der HR-Hepatoblastome zählen solche mit Befall aller vier chirurgischen Sektoren (PRETEXT VI), mit Fernmetastasen, einer extrahepatischen Invasion und/oder AFP-Werten, die unter 100 ng/ml liegen [27, 28]. Zusätzlich könnte die Einteilung nach SR- und HR-Hepatoblastomen auch aus einer Genchipanalyse erfolgen, wobei eine differenzielle Expression von 16 Genen für die Charakterisierung dieser Gruppen herangezogen werden könnte [29]. Diese molekulare Klassifizierung wurde bisher jedoch nicht in klinische Studien aufgenommen. Obwohl in der SIOPEL Studie gezeigt wurde, dass eine Monotherapie mit Cisplatin (CDDP) im Vergleich zur Kombination Cisplatin/Doxorubicin (PLADO) zu dem gleichem Outcome bei SR-Hepatoblastomen führt, wird in Deutschland als Standard zur Behandlung des HBs eine Kombinations-Chemotherapie eingesetzt [9, 10, 26]. Zur Therapie von SR-Hepatoblastomen empfehlen die „Leitlinien der Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie“ aufgrund der besseren Verträglichkeit ein Therapieregime, das bis zu drei Blöcke PLADO als neoadjuvante und mindestens einen Block PLADO als adjuvante Chemotherapie beinhaltet. Um HR-Hepatoblastome zu behandeln, wird im Augenblick eine intensivere Chemotherapie empfohlen. Diese sieht vor, Cisplatin alle zwei Wochen im Wechsel mit Carboplatin und Doxorubicin zu verabreichen, neoadjuvant sind dafür sieben Blöcke und adjuvant drei Blöcke vorgesehen. Bei Patienten mit SR-Hepatoblastom wird heute eine dauerhafte Remission von ca. 95 % erreicht, bei dem Kollektiv, das der Hochrisikogruppe zugeordnet wird, kommt es trotz der intensivierten Therapie lediglich bei 69 % zu einer dauerhaften Heilung [10, 26, 27]. Bei vielen Patienten der HR-Gruppe wie auch bei Patienten, bei denen sich Rezidive gebildet haben, konnte nach der Firstline Therapie eine gesteigerte Expression von Brustkrebs-Resistenzproteinen (BCRP, ABCG2) und sogenannten „Multidrug“-Resistenzen festgestellt werden. Da sich diese Resistenzen bei fast 80 % aller HB-Patienten entwickeln, die vier

oder mehr Chemotherapiezyklen erhalten haben, ist die Erforschung und Entwicklung alternativer Behandlungsmethoden von größter Wichtigkeit [30-32].

1.6 Zielgerichtete molekulare Krebstherapie

Ein alternativer Therapieansatz zu herkömmlichen Chemotherapeutika, die durch Hemmung von sich schnell teilenden Zellen zu schweren Nebenwirkungen wie Immunsuppression und Haarausfall führen, ist die sog. „Zielgerichtete molekulare Krebstherapie“. Unter dieser neuen Behandlungsmethode versteht man Substanzen, die durch Inhibition bestimmter Proteinen, die bei Tumorwachstum und -progression eine zentrale Rolle spielen, zu einer Hemmung der Tumorgenese und -ausbreitung führen. Durch die zielgerichtete Interaktion mit molekularen und zellulären Veränderungen, die spezifisch bei Tumorzellen auftreten, kann diese Therapie eventuell effektiver als Chemotherapie und zugleich schonender zu normalen Körperzellen sein. Diese neue Wirkstoffgruppe wird gegenwärtig in Studien als Monotherapie und in verschiedenen Kombinationsbehandlungen mit anderen Substanzen und Chemotherapeutika evaluiert [33].

Dazu gehören auch Kinase-Inhibitoren, diese Gruppe von „zielgerichteten molekularen Krebstherapien“ konkurriert mit ATP um die katalytische Bindedomäne von Kinasen und führt somit zu einer Hemmung der katalytischen Aktivität des Enzyms. Kinasen spielen eine Schlüsselrolle in der Regulation der Zellhomöostase und regulieren über Signaltransduktion viele zelluläre Prozesse wie Zellproliferation, Migration, Differenzierung und die Apoptose [34-36]. Aufgrund ihrer Bedeutung wird die Aktivität in Zellen auf mehreren Ebenen streng reguliert. Alterationen an Kinase-Genen, die zu konstitutiv aktivierten oder veränderten Kinasen führen, werden mit der Entstehung und Progression vieler Tumorlinien in Verbindung gebracht. Die häufigsten Molekularmechanismen, die zu einer deregulierten Kinaseaktivität führen, sind genomische Neuaneordnungen, Punktmutation, Deletion und Überexpression von Genen. Das Augenmerk dieser Arbeit richtet sich auf Aurora-, MET- und Wee1-Kinasen. Diese Enzyme können durch eine Vielzahl von Inhibitoren

gehemmt werden, die therapeutisch an den unterschiedlichsten Tumorentitäten getestet werden. Die im Rahmen dieser Arbeit erfolgten Experimente konzentrieren sich auf die mögliche enzymatische Inhibition durch die Kinase-Inhibitoren VX-680, SU11274 und Wee1-InhibitorII und ihren Einfluss auf HB-Zellen.

1.6.1 Die Wee1-Kinasen und der Wee1-InhibitorII

Die strenge Kontrolle des Zellzyklus von Säugetieren erfolgt durch die sequentielle Aktivierung von zellzyklusabhängigen Kinasen (CDK's) [37]. Eine Dysfunktion dieser molekularen „Checkpoints“ führt zur Proliferation von Tumorzellen. Wee1 spielt eine zentrale Rolle in der Zellzyklusregulation und regelt durch Phosphorylierung von Kinasen den Übergang von der G2 Phase in die Mitose. Die Cycline A und B bilden zusammen mit CDK1 einen aktiven Komplex der Proteine phosphoryliert die beim G2/M Übergang eine wichtige Rolle spielen. Durch Phosphorylierung von CDK1 an Threonin 14 und Tyrosin 15 wird der Komplex in seinen inaktiven Zustand überführt. Die Proteinkinase Wee1 [38] phosphoryliert an Tyr-15, während eine andere Proteinkinase (Myt1) sowohl Thr-14 als auch Tyr-15 an CDK1 phosphoryliert [39]. Zur erneuten Aktivierung des CDK1 CyclinA/B-Komplexes muss CDK2 an Thr-14 und Tyr-15 durch die Phosphatase Cdc25 dephosphoryliert werden (siehe Abb. 1).

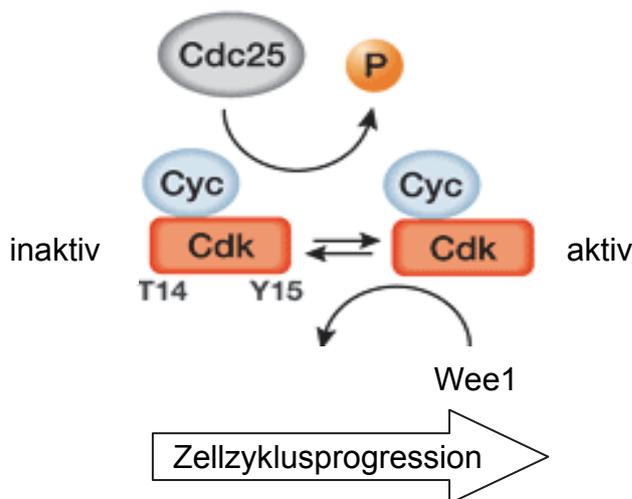


Abb. 1: Darstellung der Rolle der Wee1-Kinase in der Regulation von CDK2 (verändert nach EMBO reports 4,7 671-677 2003)

Der Wee1-InhibitorII der Firma Merck ist eine Pyrrolo-Carbazol-Mischung, die zu einer Hemmung der ATP-Bindungsstelle der Wee1-Kinase führt ($IC_{50} = 59 \text{ nM}$). Durch die Hemmung der Wee1-Kinase mit Wee1-InhibitorII kommt es zu einer dauerhaften Aktivierung des CyklinA/B CDK1-Komplexes und zu einer Disregulation des Zellzyklusses. In zahlreichen Studien konnte eine proliferationshemmende Wirkung von Wee1-Inhibitoren in Einzel- und Kombinationsbehandlungen mit Chemotherapeutika nachgewiesen werden [40, 41]. Bedingt durch die Tatsache, dass Wee1-Inhibitoren den G2/M-Kontrollpunkt aufheben und somit auch die Regulationsmechanismen außer Kraft setzten, die die DNA auf Fehler hin überprüfen, scheint die Kombination mit DNA-Schäden herbeiführenden Chemotherapeutika wie Cisplatin vielversprechend [42].

1.6.2 Der Membranrezeptor MET und SU11274

MET ist ein Membranrezeptor, der eine essentielle Rolle in der embryologischen Entwicklung und Wundheilung spielt. Der einzige bekannte Ligand für MET ist der von Stroma- und Tumorzellen gebildete „hepatocyte growth factor“ (HGF) [43]. Die Bindung von HGF aktiviert die katalytische Aktivität der Thyrosinkinase, dies führt zur Autophosphorylierung der intrazellulären Domäne und zur Aktivierung des Phosphatidylinositol 3- und MAP-Kinase-Weges [44, 45]. In vivo führt die durch HGF in Gang gesetzte Signalkaskade zu gesteigertem Zellwachstum, Zellmigration, Angiogenese, Wundheilung, Geweberegeneration und Chemotaxis [44, 45]. Gen-Amplifikationen bzw. Proteinüberexpression von MET konnte bisher bei einer großen Anzahl an soliden Tumoren wie z. B. Ovarial-, Lungen-, Haut- und Magentumoren beobachtet werden [46-49]. SU11274 ist ein Molekül, das an die ATP-Bindungsstelle der MET-Kinase bindet und diese kompetitiv inhibiert. In Studien an Zellkulturen des klarzelligen Sarkoms, des Ovariakarzinoms und des humanen malignen Melanoms führte die Inkubation mit SU11274 zu einer Hemmung der Zellproliferation und zu einer Steigerung der Anzahl apoptotischer Zellen [50-52]. In der Studie über die Wirkung von SU11274 an

Melanomzellen konnte zudem der Beweis erbracht werden, dass der Wirkstoff eine antitumorale Wirkung in vivo auf Melanome an xenotransplantierten Mäusen hat [51]. Es zeigte sich, dass es bei Hepatoblastomen nicht nur zu einer Deregulation von MET kommt, sondern darüber hinaus zu einer Überexpression von HGF und zu einer gesteigerten MET-Kinase-Aktivität bei Zellen, die mit Chemotherapeutika behandelt wurden [53, 54]. Aufgrund der Tatsache, dass eine Überexpression von MET bei Hepatoblastomen beobachtet wurde und dass eine proliferationshemmende Wirkung von SU11274 bereits in anderen Studien belegt werden konnte, wird SU11274 im Rahmen dieser Arbeit angewendet, um einen eventuellen proliferationshemmenden Effekt auf HB-Zellen zu überprüfen.

1.6.3 Die Aurorakinasen und der Aurorakinase-Inhibitor VX-680

Die Aurora-Familie der Serin/Threonin-Kinasen ist essentiell für das Voranschreiten von Körperzellen in der Mitose (siehe Abb.2) [55-58].

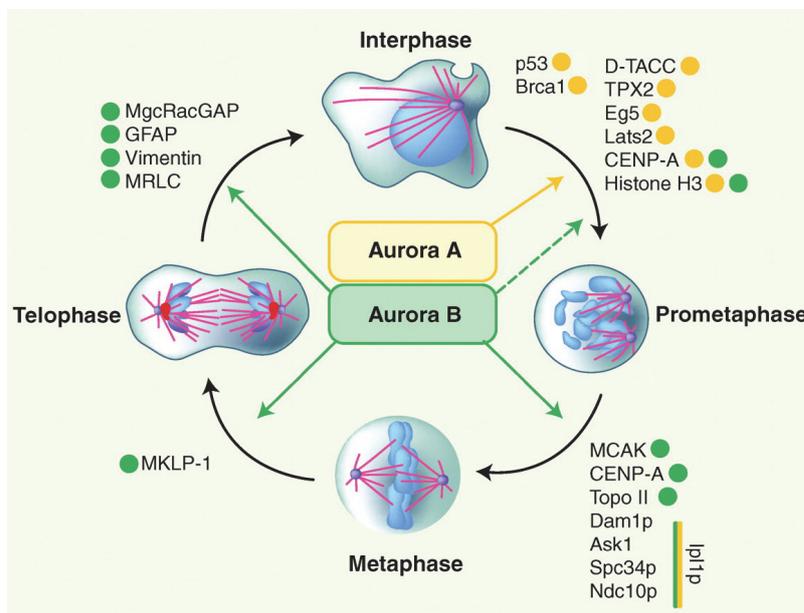


Abb. 2: Darstellung der Rolle der Aurorakinase A und B im Zellzyklus mit Zellzyklusphasen und Zielproteinen (entnommen aus Gautschi O et al. Clin Cancer Res 2008;14:1639-1648).

Die Aurorakinase A spielt eine wichtige Rolle in der Formierung der Mitosespindeln und in der Reifung der Zentrosome. Aurora A und B sind zusammen verantwortlich für die Phosphorylierung von Histon H3 an Serin 10 während der Mitose und Aurora B hat einen wichtigen Einfluss auf die Chromosomenwanderung und Zytokinese [55, 58, 59]. Die Aurorakinase B ist ein „Passagier-Protein“, das während der Prometaphase an die Zentromere gebunden ist und sich während der Ana- und Telophase im Mittelbereich der Spindelfasern befindet. Es konnte nachgewiesen werden, dass eine Hemmung der Aurorakinase B eine Unterbrechung der Kinetochor-Mikrotubuli-Interaktion bewirkt und eine Polyploidisierung der Zellen zur Folge hat [60-62]. Die Funktion und Rolle der Aurorakinase C ist hingegen noch unklar. Die Expression und Aktivität der Aurorakinasen wird während des Zellzyklusses streng reguliert, alle drei Kinasen erreichen ihre höchste Aktivität während der G2-Phase und während der Mitose, in ruhenden Zellen ist die Konzentration hingegen gering [63, 64]. Histon H3 wurde als Hauptsubstrat von Aurorakinasen in der Literatur am besten beschrieben [59, 65]. Weitere Zielproteine der Aurorakinasen sind unter anderem CENP-A [66], Topoisomerase 2 alpha [67], Vimentin [68] und viele weitere in der Zellteilung beteiligte Proteine (siehe Abb. 2). Eine Überexpression der Aurorakinasen konnte bei Darmkrebstumoren [63, 69], Brusttumoren [70], Nierenzelltumoren und anderen humanen Tumorzelllinien nachgewiesen werden [71]. Es wurde bisher eine Vielzahl an Substanzen entdeckt, die eine unterschiedliche Hemmung der Aurorakinasen zur Folge haben [72]. Der in dieser Arbeit verwendete Aurorakinase-Inhibitor VX-680 führt zu einer hochpotenten Hemmung aller drei Aurorakinasen. Durch die identischen ATP Bindungsstellen dieser Kinasen kann das VX-680 Molekül reversibel an diese binden und somit ihre enzymatische Wirkung inhibieren. Studien konnten zeigen, dass VX-680 bei vielen Tumorzelllinien zu Polyploidisierung, Apoptose und Proliferationsinhibition führt. Für Kolorektal-, Leukämie-, Brust-, Prostata-, Pankreas-, Melanom- und Zervikaltumorzellen konnte in vitro eine halbmaximale Inhibitionskonzentration (IC_{50}) der Viabilität im Bereich von 15 bis 113 nM bestimmt werden [73]. Inwieweit VX-680 eine Wirkung an Hepatoblastomzellen aufzeigt, wurde noch nicht evaluiert.

1.7 Der Histon-Deacetylase-Inhibitor Vorinostat (SAHA)

Das intrazelluläre Gleichgewicht von Acetylierung und Deacetylierung wird durch die enzymatischen Aktivitäten von Histon-Deacetylasen (HDAC) und Acetyltransferasen aufrechterhalten. Eine Hypoacetylierung von Histon-Proteinen führt zu einer verringerten Expression von Zielgenen, während eine Hyperacetylierung durch den Zugang von DNA-Regulatoren und Transkriptionsfaktoren zu den nukleosomalen DNA-Strukturen mit einer gesteigerten Genexpression einhergeht [74, 75]. Eine gesteigerte Expression von HDACs in Tumorzellen konnte in zahlreichen soliden Tumoren wie z. B. in Magentumoren und dem Prostatakarzinom gefunden werden [76, 77]. Durch die Überexpression von HDACs in Tumorzellen liegen die Histon-Proteine vermehrt in einem hypoacetyliertem Zustand vor, dadurch wird die Genexpression herunterreguliert und die Zelle „konzentriert“ sich vermehrt auf die Zellteilung [75]. Bis heute wurden insgesamt 18 HDACs beim Menschen entdeckt, diese werden, basierend auf ihrer Homologie zu Hefe-HDACs und ihrer enzymatischen Aktivität, in drei Klassen eingeteilt [78]. Vorinostat oder „suberoylanilide hydroxamic acid“ (SAHA) gehören zur großen Klasse der HDAC-Inhibitoren. SAHA bindet direkt an das katalytische Zentrum der HDAC Gruppen I und II und inhibiert diese im Bereich nanomolarer Konzentrationen ($IC_{50} < 86 \text{ nM}$).

SAHA ist unter dem Namen Zolinza seit 2006 als erster Histon-Deacetylase-Inhibitor für die Behandlung des fortgeschrittenen, refraktären, kutanen T-Zelllymphoms zugelassen [79, 80]. Es laufen außerdem mehrere klinische Studien, die die Wirksamkeit und Verträglichkeit von Vorinostat unter anderem bei Patienten mit fortgeschrittenen, metastasierten Weichteilsarkomen und in der Kombination mit Bortezomib in der Behandlung von wiederkehrenden multiplen Myelomen untersuchen [81]. Es zeigte sich, dass SAHA ein therapeutisches Potential bei mehreren neurodegenerativen Erkrankungen hat und zudem ein vielversprechendes Medikament zur Prävention und Behandlung der „frontotemporalen Demenz“ darstellt [82].

In mehreren Studien, die anhand von Zellkulturen oder Tierversuchen durchgeführt wurden, konnte ein additiver oder synergistischer Effekt von SAHA mit verschiedenen Substanzen bzw. Therapien, die zur Tumorthherapie eingesetzt werden, gezeigt werden. Dies schließt Strahlentherapie, Anthrazycline, Imatinib, den Proteasom-Inhibitor Bortezomib und neben vielen weiteren Substanzen den Aurorakinase-Inhibitor VX-680 ein [83-85]. In der Kombinationsbehandlung mit SAHA konnte die Aktivität von MK-0457 (VX-680) gegen akute und chronische myeloische Leukämiezellen in vitro signifikant gesteigert werden [86-88]. Da der HDAC-Inhibitor in seinem Wirkprofil genauso wie VX-680 an Histon H3-Proteinen ansetzt und bereits ein synergistischer Effekt der beiden Substanzen bei chronisch myeloischen Leukämiezellen beobachtet wurde, wird SAHA im Rahmen dieser Arbeit zusammen mit VX-680 an Hepatoblastomzellen eingesetzt.

1.8 Ziele dieser Arbeit

Trotz ständig verbesserter Behandlungsmethoden ist die Prognose bei Patienten mit fortgeschrittenen oder rezidierten Hepatoblastomen weiterhin schlecht. Ziel der vorliegenden Untersuchung ist die Analyse der antineoplastischen Wirkung von VX-680, Wee1-InhibitorII und SU11274 auf Hepatoblastomzellen der Zelllinien HepT1 und HuH6. Nach Untersuchung der proliferationshemmenden Wirkung der Substanzen in Einzelbehandlungen soll anschließend die Kombination mit dem Chemotherapeutikum CDDP als wichtigstes Zytostatikum in der Behandlung des bei HBs evaluiert werden. Da sowohl Aurorakinasen als auch Histon-Deacetylasen mit Histonen interagieren, soll der gemeinsame Einsatz von VX-680 und SAHA an HB-Zellen evaluiert werden.

Neben dem proliferationshemmenden Effekt steht der intrazelluläre Wirkmechanismus, der Einfluss auf die Zellmorphologie und die Apoptoseinduktion der Substanzen im Vordergrund dieser Arbeit.

Diese Untersuchungen sollen eine wissenschaftliche Basis für die Bedeutung der Kinasen und ihrer Inhibitoren in der Therapie des Hepatoblastoms bilden.

2 Material & Methoden

2.1 Materialien

2.1.1 Chemikalien

Aceton	Merck, Darmstadt
Acrylamid Rotiphorese® Gel 30	Carl Roth, Karlsruhe
Ammoniumpersulfat (APS)	Sigma Aldrich, Steinheim
Ampuwa® Wasser	Fresenius Kabi, Bad Homburg
4,6-Diamidin-2-phenylindol (DAPI)	Sigma Aldrich, Steinheim
Dithiothreitol (DTT)	Sigma Aldrich, Steinheim
Eindeckmedium Depex	Serva, Heidelberg
Eosin Certisain®	Merck, Darmstadt
Ethanol absolute	Merck, Darmstadt
EZ4U Aktivator	Biomedica, Wien, Österreich
EZ4U Substrat	Biomedica, Wien, Österreich
Formaldehydlösung, min. 37 %	Merck, Darmstadt
Glycerol	Sigma Aldrich, Steinheim
Mayer's Hämalaunlösung	Merck, Darmstadt
Methanol	Merck, Darmstadt
N,N,N',N'-Tetramethylethyldiamin (Temed)	Carl Roth, Karlsruhe
PBS	Biochrom, Berlin
Precision Plus Protein Standards	Bio-Rad, München
SDS, ≥ 99 %, für die Biochemie	Carl Roth, Karlsruhe
Treton X-100	Sigma Aldrich, Steinheim
Trizma® Base	Sigma Aldrich, Steinheim
Trypsin/Ethylendiaminacetat-Lösung	PAA Lab., Pasching, Österreich
Tween® 20	Sigma Aldrich, Steinheim
Xylol	Merck, Darmstadt
Ziegen Serum	Dako, Glostrup, Dänemark

2.1.2 Kits (Reagenziensysteme)

Roti-Lumin Chemiluminiszenz, (Carl Roth, Karlsruhe)

Roti®-Lumin 1 2 ml

Roti®-Lumin 2 2 ml

1 min Inkubation

Vectastain ABC-Kit, (Vector Laboratories, Burlingame (CA), USA)

PBS-T 500 µl

Substanz A 10 µl

Substanz B 10 µl

30 min Inkubation

DAB Reagenz, (Biocompare, San Francisco (CA), USA)

Dest. H₂O

Puffer 10 µl

DAB 20 µl

H₂O₂ 10 µl

2.1.3 Lösungen und Puffer

Anodenpuffer

Tris/CAPS Puffer 10 ml

20 % SDS 0,5 ml

H₂O 89 ml

Blockierlösung (für Western Blot)

5 % Magermilchpulver

In PBS-T

Blockierlösung (für Immunhistochemie)

Ziegenserum 500 µl

Triton X-100 30 µl

1 x TBS 9,5 ml

Citrat-Puffer

Sodium Citrat Trisodiumsalz Dihydrat ($C_6H_5Na_3O_7 \times 2 H_2O$) 2,94 g

H₂O 1000 ml

pH 6,0 Lagerung bei RT

Elektrophoresepuffer (5 x)

Tris Base 15,1 g

Glycin 94 g

SDS 10 g

In 900 ml H₂O lösen, auf pH 8,3 einstellen

und auf 1000 ml auffüllen

Eosin-Lösung 96 %

Ethanol 50 ml

Eosin 1 g

H₂O 100 ml

Lagerung bei RT

FACS Puffer

PBS 500 ml

2 % FCS 10 ml

2 mM EDTA 292,5 mg

0,005 % Natrium Azid (0,025 g/500 ml (2-3 Kristalle))

Lagerung bei 4°C

Kathodenpuffer

Tris/CAPS Puffer 10 ml

Methanol 15 ml

Dest. H₂O pH 9,6

Methanol/ Peroxidase Mischung

30 % H₂O₂ 10 ml

Methanol 90 ml

Lagerung bei -20°C

PBS-T

Tween® 20 1 ml

1 x PBS 1 l Lagerung bei RT

20 % SDS-Lösung

SDS 2 g

Essigsäure 200 µl

H₂O 10 ml Lagerung bei RT

Waschpuffer 1 x TBS

10 x TBS 100 ml

Dest. H₂O 900 ml

1 x Probenauftragspuffer

Tris-HCL (pH 6,8 bei 25°C)

2 % SDS

10 % Glycerol

50 mM DTT

0,01 % Bromophenolblau

10 x Tris Buffered Saline (TBS)

Trizma base (C₄H₁₁NO₃) 24,2 g

Sodiumchlorid (NaCl) 80 g

H₂O 1000 ml

pH 7,6 Einstellung mit konzentrierter Salzsäure

3 % Wasserstoffperoxid

30 % H₂O₂ 10 ml

Dest. H₂O 90 ml

2.1.4 Zellkulturen und Medien

2.1.4.1 Medien

Dulbecco's Modified Eagle Medium (DMEM)

Biochrom, Berlin

2.1.4.2 Medienzusätze

Fetales Kälberserum

Biochrom, Berlin

L-Glutamin, 200 mM

Biochrom, Berlin

Penicillin/Streptomycin, 10.000 U/ml / 10.000 µg/ml

Biochrom, Berlin

2.1.4.3 Verwendete Zellen

HepT1 humane Hepatoblastomzelllinie embryonaler Typ [89]

HuH6 humane Hepatoblastomzelllinie gemischter Typ [90]

2.1.5 Antikörper

2.1.5.1 Primärantikörper

Tab. 3: Auflistung aller verwendeten Primärantikörper

Bezeichnung	Quelle	Firma/ Bezugsquelle	Verwendung u. Verdünnung
Anti-Acetyl-Histon H3, polyklonal	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Danvers (MA), USA	Western Blot 1:1000 IHC 1:100
Anti-Acetyl-Histon H3(Lysin9), polyklonal	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Danvers (MA), USA	Western Blot 1:1000
Anti-Acetyl-Histon H3(Lysin18), polyklonal	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Danvers (MA), USA	Western Blot 1:1000
Anti-Acetyl-Histon H3(Lysin23), polyklonal	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Danvers (MA), USA	Western Blot 1:1000
Anti-Histon H3, polyklonal	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Danvers (MA), USA	Western Blot 1:1000
Anti-Phospho-Histon H3(Serin10), polyklonal	Kaninchen	Cell Signaling Technology, Danvers (MA), USA	FACS 1:100 IF 1:1000 IHC 1:100 Western Blot 1:1000
HEK-6D6, monoklonal	Maus	AG Bühring, UKT	FACS 1:5
W4A5, monoklonal	Maus	AG Bühring, UKT	FACS 1:5
W5D3, monoklonal	Maus	AG Bühring, UKT	FACS 1:5
W6B3C2, monoklonal	Maus	AG Bühring, UKT	FACS 1:5

2.1.5.2 Sekundärantikörper

Tab. 4: Auflistung aller verwendeten Sekundärantikörper

Bezeichnung	Quelle	Firma	Anwendung u. Verdünnung
Anti-Kaninchen IgG HRP-gekoppelter Antikörper, polyklonal	Ziege	Cell Signaling Technology, Danvers (MA), USA	Western Blot 1:1000
Anti-Kaninchen IgG biotinyliert, (H+L), polyklonal	Ziege	Biozol, Eching	IHC 1:100
Anti-Maus IgG-PE, polyklonal	Ziege	BD Biosciences, Franklin Lakes (NJ), USA	FACS 1:100 (Stammzellmarker)
FITC Anti-Kaninchen, polyklonal	Ziege	Biozol, Eching	FACS 1:100 (Immunfärbung) IF 1:100

Alle verwendeten Antikörper wurden bei -20 Grad im Tiefkühlfach gelagert.

2.1.6 Geräte und Hilfsmittel

BD FACSTM 7-Color Setup Beads	BD Biosciences, Franklin Lakes (NJ), USA
ELISA-Reader, MileniaL Kinetic Analyzer	Milenia, Gießen
Eppendorf Multipette® Xstream	Eppendorf, Hamburg
Heizplatte, HI 1220	Leica, Nussloch
Inkubator, BBD 6220	Heraeus, Hanau
Kamera, AxioCam MR colour	Carl Zeiss, Jena
Logic Shaker	Neo Lab, Heidelberg
Mikroskop, Axioskop 40	Carl Zeiss, Jena
Mikroskop, Axiovert 135	Carl Zeiss, Jena

Mikroskop, Leitz Fluovert FS	Leica, Nussloch
Mikroskop, Olympus BX60	Olympus, Hamburg
Mini Protean® 3 Cell	Bio-Rad, München
Neubauer Zählkammer	Carl Roth, Karlsruhe
Pipetboy acu IBS	Integra, Chur
Röntgen Entwicklungsmaschine Classic	AGFA, Düsseldorf
Sterilbank, LaminAir® HBL 2472 GS	Heraeus, Hanau
Trans Blot Semi-Dry Transfer Cell	Bio-Rad, München
Tuttnauer Autoclave – Steam Sterilizer	Systec, Wettenberg
Vortexer, VF	Janke&Kunkel, Staufen
Wasserbad, HI 1210	Leica, Nussloch
Zentrifuge, Biofuge 15R	Heraeus, Hanau
Zentrifuge, Mini Spin®	Eppendorf, Hamburg
Zentrifuge, Rotixa/RP	Hettich, Tuttlingen

2.1.7 Verbrauchsmaterialien

Combitips Eppendorf Biopur® plus	Eppendorf, Hamburg
Culture Slides 8 Chamber Vessel	BD Biosciences, Franklin Lakes (NJ), USA
Deckgläser, 24 x 60 mm	R. Langenbrinck, Emmendingen
Desinfektionsspray, Softasept®	B. Braun, Melsungen
Eppendorf-Tubes	Greiner, Frickenhausen
FACS-Rundbodenröhren	Becton Dickinson, Heidelberg
Falcon-Tubes, Cellstar®	Greiner, Frickenhausen
Fettstift, Dako Cytomation Pen	Dako, Glostrup, Dänemark
Hyperfilm™ ECL, Chemilumineszenz Film	AmershamBiosciences, Freiburg
Immersionöl, Immersol® 518N	Carl Zeiss, Jena
Laborhandschuhe, DermaClean®	Ansell GmbH, München
Low-binding Platten, 96-well, Costar®	Corning, Corning (NY), USA

Pipettenspitzen, SafeSeal-Tips Premium	Biozym, Oldendorf
Roti® PVDF Transfermembran	Carl Roth, Karlsruhe
Stabpipetten steril; 1ml, 2ml, 5ml, 10ml, 25ml	Falcon, Gräfelfing
Zellkulturplatte, 12-well Falcon®	Becton Dickinson, Heidelberg
Zellkulturplatte, 6-well Falcon®	Becton Dickinson, Heidelberg
Zellkulturplatte, 96-well, Falcon®	Becton Dickinson, Heidelberg
Zellkulturplatten, Rundschalen 100 x 20 mM	Sarstedt, Nümbrecht
Zellschaber, Costar®	Corning, Corning (NY), USA

2.1.8 Computerprogramme

Adobe Reader	Adobe Systems, München
AxioVision 3.1	Carl Zeiss, Jena
AxioVision Viewer 3.0	Carl Zeiss, Jena
FACS Diva Software	Becton Dickinson, Heidelberg
FCS Express V3	De Novo Software, Los Angeles (LA), USA
GraphPad Prism®, Version 4.0	GraphPad Software, La Jolla (CA), USA
Office Word 2007	Microsoft, Unterschleißheim

2.2 Methoden

2.2.1 Zelllinien

Zelllinien bestehen aus einer Gruppe von Zellen, die die Fähigkeit besitzen, sich unbegrenzt teilen zu können. Die Zellen können außerhalb des Organismus, aus dem sie stammen, unter bestimmten Laborbedingungen in speziellen Medien (in vitro) gezüchtet werden. Zelllinien finden aufgrund dieser Eigenschaften häufig Anwendung sowohl in der Grundlagen- als auch in der klinischen Forschung. Die Experimente dieser Forschungsarbeit wurden an Hepatoblastomzellen der Linien HepT1 und HuH6 durchgeführt.

2.2.1.1 HepT1

Die Hepatoblastomzelllinie HepT1 wurde 1996 von Pietsch et al. [89] charakterisiert und etabliert. Das Zellmaterial stammte aus der Leber eines 34 Monate alten Mädchens. Es konnte ausgeschlossen werden, dass der Tumor durch das Beckwith-Wiedemann-Syndrom oder durch die „Familiäre adenomatöse Polyposis Colli“ verursacht wurde. Der Tumor fiel durch ein multinoduläres und infiltrierendes Wachstum auf. Er bestand aus soliden und trabekulären Bereichen epithelialer Zellen, die sehr embryonalen Hepatozyten ähnelten, daher wurde dieser Typ als embryonaler Subtyp eingeordnet. Morphologisch zeichnen sich die Tumorzellen durch granulär-eosinophiles Zytoplasma mit pleomorphen Kernen aus, in denen sich 2-3 Nukleoli mit irregulär kondensiertem Chromatin befinden. Der Karyotyp erscheint polyploid mit 65-125 Chromosomen und zahlreichen strukturellen und numerischen Aberrationen der Chromosomen 1p, 6, 9, 11q, 13q, 15p und 20. An den Chromosomenarmen 1p und 11q finden sich Deletionen. An Chromosom 15 befindet sich Material von Chr. 6q und es finden sich zwei Isochromosomen 9p. Chromosom 20 ist mit einer Häufigkeit von 6-8 Mal am häufigsten in den Zellen vertreten. Die Zelllinien exprimieren genau wie der Primärtumor in hohem Maße

Zytokeratine, Alpha-Fetoprotein, Vimentin, Erythropoietin und den Stammzellfaktor SCF.

Die Zellpopulation verdoppelt sich ca. alle zwei Tage. Die Zellen wachsen in epithelialen, einschichtigen Clustern mit flachen, polygonalen Zellen. Werden Zellen subkutan in Nacktmäuse transplantiert, wachsen Tumoren mit denselben zytologischen Eigenschaften wie im Primärtumor heran [89].

2.2.1.2 HuH6

Die Zelllinie HuH6 wurde 1976 zum ersten Mal von Doi [90] charakterisiert und etabliert. Das Tumorgewebe stammte aus dem rechten Leberlappen eines 1-jährigen Jungen. Histologisch präsentierte sich der Tumor als differenziert und mit nodulären Strukturen. Das Kern-Plasma-Verhältnis betrug 1:1 bis 1:2 bei wenigen Kernpolymorphismen. Das Gewebe bestand aus vaskulären Anteilen, Zellen der extramedulären Hämatopoese und chondroosteogenetischem Gewebe. Zusätzlich gab es gemischte Anteile, in denen Epithelzellen, Fibroblasten und hämatopoetische Zellen zu finden waren. Aufgrund dieser Eigenschaften wird der Tumor als Hepatoblastom vom gut differenziert, gemischten Typ charakterisiert. In vitro konnte bei den Zellen die Produktion von Alpha-Fetoprotein und Albumin nachgewiesen werden. Elektronenmikroskopisch sind epitheliales Gewebe, Desmosomenbündel, Tonofibrillen, ein großer Nukleolus und glykogenreiche zytoplasmatische Granula zu erkennen. Die Zellpopulation verdoppelt sich alle 1-2 Tage. Die Zellen lassen sich in Hamster und Nacktmäuse transplantieren, in denen sie sich duktal ausbreiten [90].

2.2.2 Zellkultur

2.2.2.1 Versorgung und Aufbewahrung

Als Grundmedium für die Zellkulturen HepT1 und HuH6 wurde Dulbecco's MEM mit Zusätzen von 10 % FCS, 2mM L-Glutamin und 1 % Penicillin/Streptomycin verwendet.

Die Zellen wurden in 75 cm² Petrischalen kultiviert, in denen sie zu konfluenten Zellkulturen heranwachsen konnten. Die Aufbewahrung der Zellkulturen erfolgte in einem Inkubator bei 37° C, 5 % CO₂ und 95 % Luftfeuchtigkeit. Sämtliche Arbeiten wurden unter einer Sterilbank (HLB 2472 GS Heraeus Lamin Air) durchgeführt, und alle verwendeten Reagenzien, die in Kontakt mit den Zellen gekommen sind, auf 37° C im Wasserbad vorgewärmt. Alle drei Tage erfolgte ein Mediumwechsel, bei dem das Medium durch Pipetten abgesaugt und durch 7 ml Dulbecco's MEM ersetzt wurde. Sobald im Lichtmikroskop ein dichter Zellrasen mit fast vollständiger Konflueszenz zu sehen war, wurden die Zellen passagiert. Das Medium wurde mit Hilfe von Pipetten vollständig entfernt und anschließend wurden 3 ml PBS hinzugegeben, um die Zellen von abgestorbenem Material und Proteinen zu befreien. Nach Absaugen der PBS Lösung wurden 2 ml Trypsin-EDTA Lösung auf den Zellrasen gegeben und anschließend 3 min bei 37° C inkubiert. Das Ablösen der Zellen wurde lichtmikroskopisch kontrolliert und anschließend die durch Trypsin verursachte Proteinolyse durch die Zugabe von 4 ml Medium gestoppt. Die Zellsuspension wurde zu gleichen Anteilen auf zwei Petrischalen verteilt und durch Zugabe von Medium wieder auf ein Gesamtvolumen von 7 ml aufgefüllt. Nach ca. 2 h waren die Zellen wieder adhärent.

2.2.2.2 Zellzahlbestimmung

Für die Bestimmung der Zellzahl erfolgte zuerst die Absaugung des Mediums aus den Petrischalen, sodass nur noch die am Boden haftenden Zellen vorhanden waren. Nach Zugabe von 2 ml Trypsin-EDTA wurden die Zellen für

3 min bei 37° C inkubiert und das Ablösen der Zellen mikroskopisch überprüft. Anschließend wurde die proteolytische Wirkung von Trypsin durch Zugabe von 4 ml Medium gestoppt. Die Zellen wurden resuspendiert, in 15 ml Falcon's gefüllt und im Anschluss bei 1300 U/min (250 x g) für 3 min zentrifugiert. Der Überstand wurde abgesaugt, 5 ml Medium hinzugegeben und resuspendiert. Vor der Zählung wurde auf eine frisch mit Alkohol gereinigte Neubauer-Zählkammer ein angefeuchtetes Deckgläschen gedrückt, bis die sogenannten Newtonringe zu sehen waren. Anschließend wurde mit einer 15 µl Pipette die Zellsuspension zwischen Kammer und Deckglas getropft, durch Kapillarkräfte kam es zu einer gleichmäßigen Verteilung der Flüssigkeit in dem Zwischenraum. Unter dem Mikroskop erfolgte die Auszählung aller vier Quadranten bei 40-facher Vergrößerung. Um eine Doppelzählung der auf den Linien befindlichen Zellen zu vermeiden, wurden jeweils 2 Ränder diskriminiert. Aus der gezählten Zellzahl wurde der Mittelwert pro Quadrat bestimmt und mit dem Kammerfaktor (10^4) multipliziert. Somit konnte relativ genau die durchschnittliche Zellzahl pro ml in der Suspension bestimmt werden.

2.2.2.3 Auftauen von Zellen

Zum Auftauen der Zellen wurde das 15 ml Falcon im Wasserbad bei 37° C erwärmt, anschließend wurden 10 ml DMEM ohne Zusätze in das Falcon pipettiert. Nach der Zentrifugierung des Röhrchen bei 1300 U/min (250 x g) für 3 min wurde der Überstand verworfen und 10 ml DMEM mit Zusätzen hinzugegeben. Die Zellen wurden resuspendiert und auf eine Kulturplatte übertragen.

2.2.3 Verwendete Substanzen

2.2.3.1 Kinase- und Histon-Deacetylase-Inhibitoren

Zur Übersicht sind alle in dieser Arbeit verwendeten Kinase- und Histon-Deacetylase-Inhibitoren in der Tab. 5 aufgelistet.

Tab. 5: Verwendete Kinase- und Histon-Deacetylase-Inhibitoren

Wirkungsort und Handelsname	Chem. Summenformel	Firma
MET-Kinase-Inhibitor SU11274	(3Z)-N-(3-Chlorophenyl)-3-([91]methylene)-N-methyl-2-oxo-2,3-dihydro-1H-indole-5-sulfonamide	Biaffin GmbH & Co KG, Kassel
Wee-Kinase-Inhibitor Wee1-InhibitorII	6-Butyl-4-(2-(chlorophenyl)-9-hydroxypyrrolo[3,4-c]carbazole-1,3-(2H,6H)-dione	Calbiochem, San Diego (CA), USA
Aurorakinase-Inhibitor VX-680	C ₂₃ H ₂₈ N ₈ O ₅	Selleck Chemicals, Houston (TX), USA
Histon-Deacetylase-Inhibitor Vorinostat (SAHA)	C ₁₄ H ₂₀ N ₂ O ₃	Selleck Chemicals, Houston (TX), USA

Alle Substanzen wurden in 100 % DMSO gelöst, auf eine Konzentration von 10 mM gebracht und in 10 µl Portionen auf Eppendorf-Röhrchen verteilt. Die Lagerung der Kinase-Inhibitoren erfolgte bei -20° C, die des Histon-Deacetylase-Inhibitors SAHA bei -80° C. Eine Verdünnung der Stammlösung mit DMEM diente dazu, die gewünschte Endkonzentration zu erreichen.

2.2.3.2 Chemotherapeutika

In den Versuchen kam als einziges Chemotherapeutikum Cisplatin (CDDP) zum Einsatz. CDDP wurde von der Apotheke in der Kinderklinik bezogen und bei 4° C im Kühlschrank aufbewahrt. Um die jeweiligen Endkonzentrationen zu erreichen, wurde CDDP mit DMEM verdünnt.

2.2.4 Viabilitätsbestimmung

Der „EZ4U Cell Proliferation Assay“ der Firma Biomedica ist eine nichtradioaktive Methode zur Zellproliferations- und Zytotoxizitätsmessung. Dabei werden die Zellkulturen mit der Lösung eines Tetrazoliumsalzes versetzt und 1 h inkubiert. Lebende Zellen verstoffwechseln das gelbe Tetrazoliumsalz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyl-Tetrazoliumbromid durch die sich in den Mitochondrien befindenden Succinat-Dehydrogenasen in rote Formazan-kristalle. Die Menge an farbigen Formazan-Derivaten korreliert mit der Anzahl an lebenden Zellen. Die Absorption des entstandenen Formazans wird spektrophotometrisch bei einer Wellenlänge von 450 nm bestimmt.

2.2.4.1 Viabilitätsbestimmung von 2-dimensionalen Zellkulturen

Bei zweidimensionalen Zellkulturen handelt es sich um adhärente Zellen, die in sogenannten Monolayern wachsen. Die Zellen wurden wie unter 2.2.2.2 beschrieben gezählt und anschließend durch Zentrifugation und Zugabe des Mediums auf eine Zellzahl von 10^4 Zellen pro 100 μl gebracht. Die Zellsuspension wurde in 100 μl Mengen auf 96-Well-Platten verteilt und 24 h bei 37° C inkubiert. Es wurde eine Menge von 50 μl Kinaseinhibitoren (VX-680, Wee1-InhibitorII oder SU11274), CDDP oder dem Histon-Deacetylase Inhibitor SAHA in verschiedenen Konzentrationen in Mono- und Kombinationsbehandlungen zu den Wells gegeben, sodass sich am Ende in jedem Versuchsansatz eine Gesamtmenge von 150 μl befand. Nach 72 h Inkubationszeit wurde das „EZ4U Reagenz“ hergestellt, dazu musste eine Menge von 2,5 ml ACT (Aktivator) im Wasserbad auf 37° C erwärmt und anschließend darin ein Fläschchen SUB (Substrat) gelöst werden. In jede Probe einer 96-Well Platte wurden 15 μl Reagenz gegeben und danach die Platten für eine Stunde bei 37° C inkubiert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurden die Platten aus dem Inkubator genommen und durch sanftes Antippen an allen vier Seiten gemischt. Die Optische Dichte konnte anschließend bei einer Wellenlänge von 450 nm im ELISA-Reader gemessen werden. Die

Auswertung erfolgte über das Programm GraphPad Prism. Es wurde ein Mittelwert der Triplikate bestimmt, der Leerwert (nur DMEM) abgezogen und die Optische Dichte auf die unbehandelte Kontrolle normalisiert. Die erhaltene Viabilität wurde in Abhängigkeit von der Konzentration in einer nicht linearen Kurve mit variabler Steigung dargestellt. Aus den Parametern der Kurve konnte die IC₅₀ (Konz. bei der die Viabilität der Kultur bei 50 % lag) berechnet werden.

2.2.4.2 Viabilitätsbestimmung von 3-dimensionalen/sphäroiden Zellkulturen

Zur Evaluation der Substanzen an chemoresistenten Zellen wurden künstliche „Multidrug“-Resistenzen der Zelllinien HepT1 und HuH6 erzeugt. Es wurden 2×10^5 Zellen pro Well in eine spezielle, mit Hydrogel beschichtete 96-Well-Platte gegeben. Bedingt durch die Hydrogelbeschichtung und die hohe Zellzahl wuchsen die Zellen nicht adhärent, sondern ordneten sich in klusterförmigen, sphäroiden 3-dimensionalen Kulturen an. Im Unterschied zu 2D-Kulturen weisen Sphäroide eine heterogene Zellverteilung auf, d. h. nur die in der Peripherie lokalisierten Zellen teilen sich aktiv, wodurch eine 3-dimensionale Raumordnung entsteht. An den bei Sphäroiden auftretenden „Multidrug“-Resistenzen lassen sich Chemoresistenzen imitieren und es lässt sich die Frage klären, ob diese mit alternativen Substanzen umgangen werden können. In den Experimenten wurde VX-680 in Einzel- und in Kombinationsbehandlung mit SAHA in einer aufsteigenden Konzentrationsreihe evaluiert. Im Gegensatz zu 2-dimensionalen Kulturen wurden 2×10^5 Zellen und die mit Hydrogel beschichtete 96-Well-Platte verwendet. Um die Viabilität der Zellen nach 72 h Inkubation zu bestimmen, musste zuerst die sphäroidale Struktur durch einen kleinen Stab aufgelöst werden, anschließend konnte die Viabilitätsbestimmung wie unter 2.2.4.1 beschrieben durchgeführt werden.

2.2.5 Western Blot

2.2.5.1 Allgemein

Der Western Blot ist eine Methode, bei der elektrophoretisch aufgetrennte Proteine aus einem Trenngel auf einen geeigneten Träger, z. B. Nitrozellulose oder Nylon, übertragen werden. Hierbei wird eine Kopie des Gels produziert, wobei es zu einer Immobilisierung der Proteine auf dem Filter kommt. Die Bindung der Makromoleküle an Nitrocellulose erfolgt über hydrophobe Wechselwirkungen und Wasserstoffbrücken.

Das ursprünglich im Gel erhaltene Trennmuster der Protein-Moleküle bleibt nach der Übertragung erhalten, sodass man eine exakte Replik des ursprünglichen Gels bekommt. Unter idealen Bedingungen tritt beim Transfer keine Veränderung sowohl der Immunreaktivität als auch der funktionellen Aktivität der Proteine, z. B. deren enzymatischen Aktivität, auf.

Da die Proteine nach dem Transfer für die Behandlung mit verschiedenen Liganden, Antikörpern, Lectinen oder Enzymsubstraten zugänglich sind, erlaubt der Einsatz der Blotting-Technik nicht nur auf einfache Weise qualitative und quantitative Bestimmungen einzelner Proteine in einem komplexen Gemisch anderer Proteine, sondern auch deren Identifikation [92].

2.2.5.2 Proteingewinnung

Die Anwendung des Western Blot-Verfahrens diente dazu, den Einfluss von SAHA und VX-680 auf Histon H3-Proteine der Zelllinien HepT1 und HuH6 zu untersuchen. Besondere Aufmerksamkeit galt der Veränderung der Phosphorylierung und Acetylierung der Histon H3-Proteine. Für die Versuche wurden 6-Well-Platten mit 2×10^5 Zellen und 2 ml DMEM Medium mit Zusätzen pro Well verwendet. Nach 24 h wurden die verwendeten Substanzen in unterschiedlichen Konzentrationen in Einzel- und Kombinationsbehandlungen zu den Zellkulturen hinzugefügt. Nach weiteren 24 h Inkubation wurden die Zellen in PBS gewaschen, 150 μ l Probenauftragspuffer in die Wells gegeben

und die Platte anschließend 15 min auf Eis gestellt. Durch diesen Vorgang kam es zu einer Auflösung der Zellen, die zur Freisetzung intrazellulärer Proteine führte. Anschließend wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst und in 1,5 ml Eppendorf Röhrchen übertragen. Die Eppendorf Röhrchen wurden für 5 min in ein kochendes Wasserbad gestellt, wodurch es zur Denaturierung der Proteine kam, anschließend folgte die Zentrifugation der Röhrchen für 5 min bei 1300 U/min (250 x g). Durch die Zentrifugation konnte sich ein eventuelles Präzipitat absetzen, der Überstand, in dem sich auch die gelösten Histone-Proteine befanden, wurde in ein neues Eppendorf-Röhrchen gefüllt und danach bei -80° C eingefroren.

2.2.5.3 Herstellung der Gele

Für 8 cm × 7,3 cm Gele (1,5 mm dick) wurden die entsprechenden Glasplatten mit Ethanol gereinigt und anschließend mit fussellosem Tuch abgewischt. Die Platten wurden zusammengesetzt und in die Vorrichtung von Bio-Rad gespannt.

Anschließend wurde zur Herstellung des Trenngels (12 %) die in Tab. 6 aufgeführten Lösungen verwendet.

Tab. 6: Zusammensetzung eines Trenngels (12 %)

Acrylamid/Bisacrylamid Lösung	6 ml
APS	75 µl
Dest. Wasser	5,25 ml
SDS (20 %)	75 µl
Temed	7,5 µl
Trennpuffer	3,75 ml

Nach Zugabe der beiden letzten Komponenten APS und TEMED wurde die Lösung jeweils kurz durchgemischt und das Gel anschließend mit Hilfe einer 5 ml Stabpipette in die Öffnung zwischen Glas und Deckglass gegossen. Direkt nach dem Gießen wurde die Flüssigkeit mit n-Propanol überschichtet, um einen

geraden Gelrand zu erhalten. Nach ca. 2 Stunden wurde das Propanol vom polymerisierten Trenngel abgegossen und die Reste mit Wasser abgespült. Die verbliebene Flüssigkeit wurde mit Filterpapier abgesaugt.

Damit die Apparatur mit Proben beladen werden konnte, musste das Sammelgel (6 %) aus Lösungen der Tab. 7 hergestellt werden. Nach Zugabe der letzten Komponenten TEMED und APS wurde die Lösung schnell mit einer 5 ml Pipette durchgemischt und sofort auf das polymerisierte Trenngel gegeben. Direkt nach dem Gießen wurde der Probenkamm eingesetzt. Nach ca. 1–2 h war die Polymerisierungsreaktion vollständig abgelaufen und die Gele konnten mit den Proben beladen werden.

Tab. 7: Zusammensetzung eines Sammelgels (6%)

Acrylamid/Bisacrylamid-Lösung	750 µl
APS	75 µl
Dest. Wasser	1,87 ml
Sammelpuffer	875 µl
TEMED	3,5 µl

2.2.5.4 Gelelektrophorese und Protein-Blotting

Nach vollständiger Polymerisation wurde das sich zwischen Glas und Deckglas befindliche Gel in die Mini Protean® 3 Cell Apparatur von Bio-Rad eingebaut und die Behälter mit Laufpuffer gefüllt. Anschließend folgte die Entnahme des Probenkamms und es konnte mit der Befüllung der Kammern begonnen werden. Nach der Erwärmung der Proteinextrakte im Wasserbad wurden anschließend jeweils 20 µl in jede Kammer pipettiert. Zur Kalibrierung der Proteinbanden wurde die vorderste Kammer mit 20 µl Precision Plus Protein Standards befüllt. Die Gelelektrophoreseapparatur wurde auf 200 V eingestellt und für 35 min laufen gelassen. Während der gelelektrophoretischen Auftrennung der Proteine musste die Roti® PVDF Transfermembran zur Aktivierung für 15 min in Methanol gelegt und danach mit dest. Wasser gewaschen werden. Es wurde jeweils ein extradickes Blotpapier in

Kathodenpuffer und ein weiteres in Anodenpuffer für 5 min eingelegt. Daran anknüpfend erfolgte die Übertragung der Blotpapiere und des Gels aus der Gelelektrophoreseapparatur auf die Trans-Blot Apparatur von Bio-Rad nach dem in Abb. 3 dargestellten Schema.

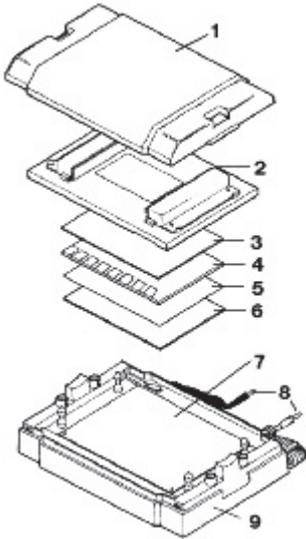


Abb. 3: Überblick über den Aufbau von Trans-Blot SD cell: 1, Sicherheitsdeckel; 2, Kathode; 3, Filterpapier mit Kathodenpuffer getränkt; 4, Gel; 5, Transfermembran; 6, Filterpapier mit Anodenpuffer getränkt; 7, Anoden-Plattform; 8, Stromkabel; 9, Basis (Schema nach Bio-Rad).

Nachdem das Gel und die aktivierte Membran in die in Abb. 3 dargestellte Trans-Blot Apparatur gelegt wurden, erfolgte die Übertragung der Proteine aus dem Gel auf die Membran für 30 min bei einer Spannung von 10 V. Nachfolgend wurde die Membran 1 h zum Blockieren in 5 % Milchpulver in PBS eingelegt. Die verwendeten Primärantikörper wurden 1:1000 in 5 % Milchpulver in PBS verdünnt, mit der Membran eingeschweißt und über Nacht bei 4° C inkubiert. Am nächsten Tag konnten durch 3 x 5 min Waschen mit PBS-T die unspezifisch gebundenen Antikörper entfernt werden. Nach der Verdünnung des Sekundärantikörpers Anti-Kaninchen IgG, HRP linked (1: 1000 in PBS-T) wurden 2-3 ml des verdünnten Antikörpers zusammen mit der Membran eingeschweißt und zur homogenen Verteilung auf der Membran 1 h auf den Neo Lab Logic Shaker gegeben. Danach wurde die Membran erneut für 3 x 5 min mit PBS-T gewaschen. Anschließend wurden das Roti-Lumin Chemilumineszenz Substrat 1 und 2 zu gleichen Teilen miteinander in einem Gefäß vermischt und die Membran hinzugegeben. Nach ca. 1 min wurde die

Membran aus der Flüssigkeit genommen und in einer lichtundurchlässigen Box für eine bestimmte Zeit auf Röntgenpapier gelegt. Nach der Entwicklung in der Entwicklungsmaschine Classic EOS von AGFA waren die Banden in unterschiedlichen Stärken auf dem Röntgenpapier sichtbar. Durch die Kalibrierung mit „Precision Plus Protein Standard“ war es möglich, die abgebildeten Banden einem bestimmten Molekulargewicht zuzuordnen.

2.2.6 Apoptosebestimmung mittels NucView Caspase-3 Detektion

Um apoptotische Zellen in einer Kultur sichtbar zu machen, wurde das „NucView TM 488 Caspase-3 Kit for Living cells“ verwendet. Das Substrat detektiert die Caspase-3 Aktivität in lebenden Zellen. Dabei besteht das nicht fluoreszierende Substrat aus einem DNA-Farbstoff und einem DEVD-Peptid, welches spezifisch Caspase-3 erkennt. Es dringt in die Zelle ein, wird durch die aktive Caspase-3 gespalten und setzt so den hochaffinen DNA-Farbstoff frei. Dieser diffundiert in den Zellkern und fluoresziert im hydrophoben Milieu der Nucleoside.

Für die Versuche wurden Kulturen von HepT1 und HuH6-Zellen auf 96-Well-Platten zu je 1×10^4 Zellen je Well ausgesät. Die Zellen wurden 24 h inkubiert und anschließend mit Mono- und Kombinationsbehandlungen von SAHA und VX-680 in verschiedenen Konzentrationsreihen behandelt. Nach weiteren 24 h im Inkubator bei 37° C wurden pro Well 5 µl des NucViewTM 488 Caspase-3 Substrates direkt auf die Zellen gegeben, durch leichtes Schwenken der Platten gemischt und für 30 min bei RT inkubiert. Um zusätzlich die Zellkerne sichtbar zu machen, erfolgte die Zugabe des DAPI Reagenz in einer Endkonzentration von 10 µM. Unter einem Fluoreszenzmikroskop (Axiovert 135, Carl Zeiss) wurden die Zellen im grün fluoreszierenden Bereich über eine Kamera (AxioCam MR, Carl Zeiss) abfotografiert und die Anzahl an fluoreszierenden Zellen der verschiedenen Versuchsansätze mit der Kontrolle verglichen.

2.2.7 Durchflusszytometrie

2.2.7.1 Allgemein

Die Durchflusszytometrie wird dazu verwendet, die Eigenschaften von Zellen und Zellbestandteilen zu untersuchen, während die Zellen hintereinander durch eine dünne Messkammer fließen. Für die meisten Anwendungen der Durchflusszytometrie ist diese Flusszelle aus Glas, und die zu untersuchenden Zellen werden beim Durchfließen von der Seite mit Hilfe eines Laserlichts angestrahlt. Wenn Zellen den Laserstrahl kreuzen, verursachen sie Streulicht (engl. Light Scatter). Je größer eine Zelle ist, und je mehr Strukturen in ihrem Inneren sind, desto größer ist das entstehende Streulicht.

Das Streulicht wird an 2 Stellen gemessen:

- a) (fast) in Richtung des ursprünglichen Strahls (Vorwärtsstreulicht) und
- b) etwa im 90°-Winkel zum ursprünglichen Strahl (Seitwärtsstreulicht)

a) Das Vorwärtsstreulicht (engl. Forward Light Scatter, Abk. FSC)

Mit dem Vorwärtsstreulicht wird vor allem die Größe der Zellen gemessen. Je größer eine Zelle ist, desto mehr wird das Licht des Laserstrahls abgelenkt.

b) Das Seitwärtsstreulicht (engl. Side Scatter, Abk. SSC)

Mit dem Seitwärtsstreulicht wird die Granularität der Zellen wiederspiegelt. Finden sich z. B. in einer Zelle viele Lysosomen, hat die Zelle eine größere Seitwärtsstreuung als eine Zelle mit wenig Lysosomen.

Durch Verwendung von Antikörpern, an die fluoreszierenden Gruppen kovalent gebunden sind, können verschiedene Strukturen einer Zelle markiert werden. Beim Durchqueren des Laserstrahls wird die fluoreszierende Gruppe angeregt und das Lichtsignal kann im Durchflusszytometer detektiert werden [91].

2.2.7.2 FACS-Analyse für Immunfärbung

Die Methode der Durchflusszytometrie wurde unter anderem dazu verwendet, die Abnahme von phosphorylierten Histon H3-Proteinen unter Behandlung von VX-680 und SAHA zu untersuchen. Dabei kam ein Anti-Phospho-Histon H3 (Serin 10) Antikörper zum Einsatz, der spezifisch an phosphorylierte Serinreste von Histon H3-Proteinen bindet. Durch Verwendung eines FITC-Sekundärantikörpers konnten die Zellen mit phosphorylierten Histon H3-Proteinen, an die der Anti-Phospho-Histon H3 (Serin 10) Ak gebunden hatte, im FACS-Gerät detektiert werden. Für die Experimente wurden Kulturen von HepT1 und HuH6-Zellen auf 12-Well-Platten zu je 1×10^5 Zellen je Well ausgesät. Die Zellen wurden 24 h inkubiert und anschließend mit Mono- und Kombinationsbehandlungen von SAHA und VX-680 in verschiedenen Konzentrationsreihen behandelt. Nach 24 h wurden der Überstand der Platten in Reagenzgläser übertragen, die Wells mit 0,5 ml PBS gewaschen, der Überstand mit der Pipette abgesaugt und auch in das jeweilige Reagenzglas gegeben. Durch die Zugabe von 0,5 ml Trypsin in die Wells erfolgte nach einer 3-minütigen Inkubation die Ablösung der adhärenen Zellen. Diese wurden anschließend abgesaugt und in das Reagenzglas gegeben. Die Reagenzgläser wurden bei 1300 U/min (250 x g) 5 min zentrifugiert und danach der Überstand verworfen. Um die Zellen zu fixieren, wurde zu jedem Zellpelett 3,7 % Formaldehyd (1 ml) gegeben und 10 min bei RT inkubiert. Anschließend wurden die Reagenzgläser bei 1300 U/min (250 x g) 5 min zentrifugiert und der Überstand verworfen. Darauffolgend wurden die Zellen mit FACS-Puffer gewaschen (3 ml/Tube), durchgemischt, zentrifugiert und der Überstand erneut verworfen. Zum Blockieren der Zellen wurden dem Zellpelett 100 μ l 1 % Ziegen Serum in PBS-Tween zugesetzt und das FACS-Röhrchen auf dem Vortexer durchgerührt. Nach einer Stunde wurde 1 μ l Anti-Phospho-Histon H3 (Serin 10) Ak hinzugegeben und die Röhrchen über Nacht im Kühlschrank inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Röhrchen mit 3 ml FACS-Puffer gewaschen, erneut zentrifugiert und nach Verwerfen des Überstandes der Sekundärantikörper FITC Anti-Kaninchen 1:100 verdünnt in PBS-T

hinzugegeben. Die Röhrchen wurden für 30 min bei RT in eine dunkle Kammer gestellt, danach mit FACS-Puffer gewaschen, zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach Aufnahme des Zellpelletts in 300 µl FACS-Puffer wurde das Röhrchen gerüttelt und die Messung am FACS-Gerät durchgeführt (Exzitation: 488 nm, Emission: 520 nm).

2.2.7.3 FACS-Analyse von Stammzellmarkern

Um zu überprüfen, ob die überlebenden Zellen in einer Petrischale nach einer Langzeitbehandlung Stammzellcharakter haben, wurde eine durchflusszytometrische Untersuchung mit Antikörpern durchgeführt, die sich gegen Oberflächenmarker einer Subpopulation von mesenchymalen Stammzellen und neuronalen Progenitorzellen richten. Diese wurden uns freundlicherweise von der AG Bühring zur Verfügung gestellt (Dr. Bühring Medizinische Klinik II, UKT, persönliche Angaben).

Für die Durchführung des Versuches wurden jeweils drei dichtbewachsene 10 cm-Petrischalen der Zelllinien HuH6 und HepT1 mit 10 µM VX-680, 0,2 µM SAHA und einer Kombination aus 10 µM VX-680 und 0,2 µM SAHA behandelt. Die Zellen wurden 72 h inkubiert, dann wurde ein Medienwechsel durchgeführt und die Zellen erneut mit den gleichen Konzentrationen inkubiert. Die HuH6-Zellreihe wurde nach insgesamt 96 h untersucht, die HepT1-Zellreihe nach 144 h. Die überlebenden Zellen wurden anschließend fotografiert und die Größen der Zellen mit denen der unbehandelten Kontrolle verglichen. Danach wurden die Zellen nach folgendem Protokoll auf ihre Eigenschaften den Stammzellcharakter betreffend untersucht.

Zuerst wurde das Zellpellet in PBS gewaschen und die toten Zellen durch Absaugen entfernt. Anschließend wurden die adhärennten Zellen durch Trypsinierung von ihrem Untergrund gelöst, in 15 ml Falcons pipettiert und bei 1300 U/min (250 x g) für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und in jedes Falcon 3 ml Waschpuffer gegeben. Die Falcons wurden auf dem Vortexer durchgerührt, erneut zentrifugiert und nach Verwerfen des Überstandes wurden die Zellen in 300 µl Waschpuffer aufgenommen und

durchgerührt. Die Zellen aus jedem Falcon wurden in 50 µl-Mengen auf fünf FACS-Röhrchen verteilt. Das erste Röhrchen diente jeweils als Negativkontrolle, d. h. es wurde sowohl bei den behandelten Zellen als auch bei der Kontrolle kein Antikörper hinzugegeben. In die anderen vier Röhrchen wurde jeweils 10 µl Antikörper

(W4A5 Ak, W5D3 Ak, W6B3C2 Ak und HEK-6D6 Ak) hinzugegeben.

Nach Zugabe der Antikörper wurden die Zellen durchgerührt und 30 min auf Eis inkubiert. Unspezifisch gebundene Ak wurden durch Waschen der Zellen in 3 ml Waschpuffer, Zentrifugierung und Verwerfen des Überstandes entfernt. Daraufgehend wurden zu jedem Zellpelett 50 µl Sekundärantikörper Anti-Maus IgG-PE 1:100 verdünnt in Waschpuffer hinzugegeben. Die Proben wurden 30 min im Kühlschrank inkubiert, danach mit 3 ml Waschpuffer gewaschen, zentrifugiert und nach Verwerfen des Überstandes in 200 µl Waschpuffer aufgenommen. Die Auswertung erfolgte anschließend am Durchflusszytometer (Exzitation: 488 nm, Emission: 564-606 nm).

2.2.8 Immunhistochemische Untersuchung

Immunhistochemische Untersuchungen dienen der Examinierung von Geweben auf bestimmte Strukturen. In den Versuchen wurde durch Antikörper überprüft, ob sich in den HB-Gewebeschnitten phosphorylierte bzw. acetylierte Histone nachweisen lassen. Es kamen sowohl aus Patienten gewonnene Kryoschnitte als auch aus Xenotransplantaten stammende Paraffinschnitte zur Anwendung.

2.2.8.1 Kryoschnitte

Die Kryoschnitte wurden von den Medizinisch-technischen Assistenten (MTA) der kinderchirurgischen Abteilung aus humanen HB-Proben hergestellt. Dabei wurden mit Hilfe eines Kryostaten ca. 10 Schnitte pro Tumorprobe mit einer Schichtdicke von 10-15 µm angefertigt. Damit sich das Einbettmedium nicht verflüssigt, wurden die eingebetteten Gewebe bei einer Temperatur von -20° C geschnitten. Der fertige Schnitt konnte danach auf einen Objektträger

aufgenommen, für 10 min bei RT getrocknet und anschließend bei -80° C gelagert werden.

Die Präparate wurden aus dem -80° C Kühlschrank genommen und für 15 min in ein -20° C Fach gelegt, um ein Brechen der Schnitte bei einem abrupten Temperaturwechsel zu verhindern. Die Schnitte wurden auf der Werkbank getrocknet, anschließend in ein Aceton-Methanol-Gemisch (1:1) gegeben und 5 min fixiert. Nachdem die Flüssigkeit verflogen war, wurden die Gewebe mit einem Fettstift umrandet und für 5 min in Waschpuffer (1 x TBS) gewaschen. Anschließend wurden die Deckgläser zur Neutralisierung der endogenen Peroxidase für 10 min bei RT in 3 %igem H₂O₂ in Methanol inkubiert und danach 2 x 5 min mit Waschpuffer gewaschen. Zur Blockierung der Gewebe erfolgte die Zugabe von in PBS-T gelöstem 1 %igem Ziegen Serum und eine 30-minütige Inkubation bei RT in einer Feuchtkammer. Die Blockierflüssigkeit wurde entfernt und die Primärantikörper 1:1000 in Blockierflüssigkeit verdünnt zu den Geweben gegeben. Verwendet wurden Anti-Acetyl-Histon H3 und Anti-Phospho-Histon H3 (Serin 10) Ak. Die Schnitte wurden im Kühlschrank bei 4° C über Nacht inkubiert. Die Flüssigkeit wurde am nächsten Tag entfernt und die Gewebe 3 x mit Waschpuffer gewaschen. Auf jedes Gewebe wurde nun biotinylierter Anti-Kaninchen Sekundärantikörper gelöst in Blockierflüssigkeit (1:100) gegeben und für 30 min bei RT inkubiert. Gleich nach Zugabe des Sekundärantikörpers wurde das ABC-Kit (Vector SK-6100) hergestellt und ebenfalls für 30 min bei RT inkubiert. Nach dieser Zeitspanne wurden die Schnitte 3 x mit Waschpuffer gewaschen und anschließend 300 µl DAB Reagenz zu den Geweben gegeben. Sobald sich in den Geweben braune Punkte gebildet hatten, wurden die Schnitte 10-15 min in dest. H₂O gewaschen. Um die Gewebe in Hämatoxylin-Eosin Färbung darzustellen, wurden sie für 2 min in Meyer's Hämalaunlösung getränkt und für 5 min unter fließendem Leitungswasser gebläut. Die Schnitte wurden 5 x in Eosin-Lösung getaucht und für 2 min unter fließendem Leitungswasser gewaschen. Über eine aufsteigende Alkoholreihe (1 x 70 %, 1 x 95 %, 2 x 100 % Ethanol für je 5 min) und Xylol (1 x 5 min) wurden die Schnitte entwässert und anschließend mit Depex eingedeckelt.

2.2.8.2 Paraffinschnitte

Wie die Kryoschnitte wurden die aus Xenotransplantaten gewonnenen Paraffinpräparate von den MTAs des kinderchirurgischen Labors hergestellt. Aus jedem Paraffinblock wurden dafür an einem Mikrotom ca. 10 Schnitte pro Tumorprobe mit einer Schichtdicke von 4-5 µm angefertigt. Um eine vorteilhafte Konsistenz für den Zuschnitt zu erhalten, wurden die Paraffinblöcke zuvor über Nacht bei -20° C gelagert. Die hergestellten Präparate wurden mit einem Pinsel in ein 45° C warmes Wasserbad überführt und dadurch gestreckt. Darauffolgend wurden die Schnitte glatt auf einen Objektträger positioniert und auf einer 60° C heißen Heizplatte getrocknet. Die Lagerung bis zur Weiterverarbeitung erfolgte bei RT. Über Xylol (3 x 5 min) und eine absteigende Alkoholreihe (2 x 100 %, 2 x 95 % je 5 min) erfolgte die Deparaffinierung der Gewebe. Anschließend wurden die Schnitte für je 5 min in dest. H₂O gewaschen. Im Gegensatz zu Kryoschnitten mussten bei Paraffinschnitten die Antigene demaskiert werden, damit die Antikörper zu den Antigenen gelangen konnten. Dafür wurden die Gewebeschnitte in einem Dampfkochtopf in 1 x Citrat-Puffer kurz zum Kochen gebracht, die Kochplatte ausgeschaltet und die Schnitte nach 10 min aus dem Topf entnommen. Die Gewebe wurden 3 x 5 min in dest. H₂O gewaschen, anschließend in 3 % Wasserstoffperoxid für 10 min inkubiert und danach erneut 2 x 5 min mit dest. H₂O gewaschen. Nachdem die Schnitte erneut für 5 min in Waschpuffer gewaschen worden waren, erfolgte die Blockierung in 1 %igem Ziegenserum, gelöst in PBS-T, ab da war das Protokoll identisch zu dem unter 2.2.8.1 beschriebenen Immunhistochemie-Protokoll für Kryoschnitte.

2.2.9 Immunfluoreszenzfärbung

Die Immunfluoreszenz wurde verwendet, um durch Farbexpression phosphorylierte Histon H3-Proteine auf einem Bild darzustellen. Es wurde von HepT1- und HuH6-Zelllinien jeweils eine Kulturplatte mit 8 Kammern der Firma BD Bioscience angelegt und in jede Abteilung eine Zell/Medium-Suspension

von 150 µl mit ca. 5×10^4 Zellen gegeben. Den Zellen wurde 24 h Zeit gegeben, um sich abzusetzen, anschließend wurden in die Wells verschiedene Konzentrationen von Einzel- und Kombinationsbehandlungen mit VX-680 und SAHA gegeben. Nach 24 h wurden die Kammern sanft mit PBS gewaschen. Das PBS wurde aspiriert und die Zellen mit einer Lage von 2-3 mm 3 % Formaldehyd, gelöst in PBS, bedeckt. Die Zellen wurden 15 min bei RT fixiert. Das Formaldehyd wurde anschließend aspiriert und die Kammern 3 x 5 min mit PBS-T gewaschen. Zum Blockieren wurde Ziegenserum 1:100 mit PBS-T vermischt, auf die Zellen in den Kammern gegeben, so dass alle bedeckt waren, und für 60 min auf den Zellen gelassen. Anti-Phospho-Histon H3 (Serin 10) Antikörper wurde 1:1000 in Blockierpuffer vermischt, die Blockierlösung aspiriert und 300 µl in jede Kammer gegeben. Die Zellen wurden über Nacht bei 4° C im Kühlschrank inkubiert. Durch Waschen wurden die Zellen (3 x 5 min PBS) von Überresten des Primärantikörpers befreit, anschließend wurde der Sekundärantikörper FITC Anti-Kaninchen in einer Endverdünnung von 1:100 in Blockierlösung zu den Zellen gegeben. Für die Kerndarstellung wurde DAPI in einer Endkonzentration von 10 µM in die Kammern gegeben. Nach einer 2-stündigen Inkubationszeit im Dunkeln bei RT wurden die Zellen 3 x 5 min mit PBS gewaschen und anschließend mikroskopiert und photographiert.

3 Ergebnisse

3.1 Wirkung von Kinase-Inhibitoren auf die Viabilität von HB-Zellen

3.1.1 Einfluss von VX-680, Wee1-InhibitorII und SU11274 auf die Proliferation von HB-Zellen

In einem ersten Test wurde die Wirkung der Kinase-Inhibitoren VX-680, Wee1-InhibitorII und SU11274 auf HB-Zellen in einem Proliferationsassay bewertet. Kulturen von HepT1 und HuH6-Zellen wurden für 72 h mit Inhibitoren in aufsteigenden Konzentrationen (0-100 μM) kultiviert. Anschließend erfolgte die Bestimmung der Zellviabilität mit Hilfe des EZ4U Zellproliferationsassays.

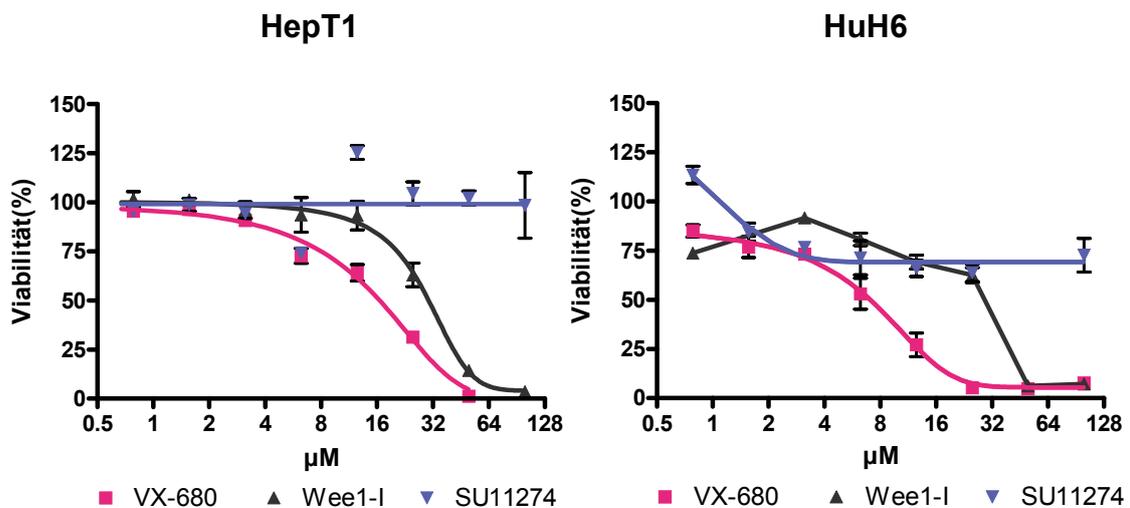


Abb. 4: Wirkung der Kinase-Inhibitoren VX-680, Wee1-InhibitorII (Wee1-I abgekürzt) und SU11274 auf die Viabilität von HB-Zellen. HepT1- und HuH6-Zellen wurden mit aufsteigenden Konzentrationen der Kinase-Inhibitoren (0 μM bis 100 μM) für 72 h behandelt. Die relative Zellviabilität wurde im EZ4U Proliferationsassay bezogen auf eine unbehandelte Kontrolle bestimmt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichung von Triplikaten.

Wie Abb. 4 zeigt, führten die verschiedenen Kinase-Inhibitoren zu einer unterschiedlichen Beeinflussung der Zellviabilität. Unter Wirkung des MET-Kinase-Inhibitors SU11274 konnte bei der HepT1-Zelllinie keine und bei der HuH6-Zelllinie nur eine geringe Proliferationshemmung beobachtet werden. Bei beiden Zelllinien war keine Konzentration unter Behandlung von SU11274 bestimmbar, bei der eine 50 %ige Wachstumsinhibition (IC_{50}) erreicht wurde. Bei den Zellen, die mit dem Aurorakinase-Inhibitor VX-680 inkubiert wurden, trat sowohl bei HuH6 als auch bei HepT1 eine Proliferationshemmung auf. Während die IC_{50} für HuH6-Zellen unter Behandlung von VX-680 bei $8,0 \pm 1,1 \mu\text{M}$ lag, wurde bei HepT1-Zellen die halbmaximale Wachstumsinhibition erst bei einer Konzentration von $16,6 \pm 1,2 \mu\text{M}$ VX-680 erreicht. Betrachtet man die Proliferationskurven der Zellen, die mit dem Wee1-InhibitorII inkubiert wurden, so zeigte sich eine 50 %ige Wachstumsinhibition bei HepT1-Zellen erst bei einer Konzentration von $29,2 \pm 1,1 \mu\text{M}$. Bei HuH6-Zellen lag der IC_{50} Wert für den Wee1-Inhibitor II mit ca. $29 \mu\text{M}$ in einem ähnlichen Bereich wie bei HepT1-Zellen, allerdings konnte aufgrund des großen Konfidenzintervalls der exakte Wert nicht bestimmt werden. Es war zu verzeichnen, dass bereits geringere Konzentrationen des Aurorakinase-Inhibitors zu einer Reduktion der Viabilität von HepT1-Zellen führten, als es unter Behandlung des Wee1-InhibitorsII der Fall war. Zusammengefasst zeigte von den drei verwendeten Substanzen VX-680 bei beiden Zelllinien die stärkste Proliferationshemmung, wobei für eine 50 %ige Wachstumsinhibition bei HepT1-Zellen ca. die 2-fache Konzentration verwendet werden musste wie für HuH6-Zellen.

3.1.2 Einfluss von Wee1-InhibitorII in Kombination mit CDDP auf die Proliferation von HB-Zellen

Wee1-InhibitorII zeigte in der Einzelbehandlung eine deutlich schwächere Proliferationshemmung als VX-680, jedoch konnte in Studien beobachtet werden, dass Wee1-Inhibitoren oft in Kombination mit anderen, vor allem die DNA schädigenden Substanzen zu einer Wirkungsverstärkung beitragen können [42]. Wee1-InhibitorII wurde mit CDDP kombiniert, da dieses

Chemotherapeutikum als Standardmedikament in der Behandlung von Hepatoblastomen eingesetzt wird und auch eine breite Anwendung bei weiteren PRETEX-Gruppen findet [27, 93]. Die verwendete Konzentration von CDDP entsprach der IC_{50} , die aus Vorversuchen an der HuH6-Zelllinie ermittelt werden konnte.

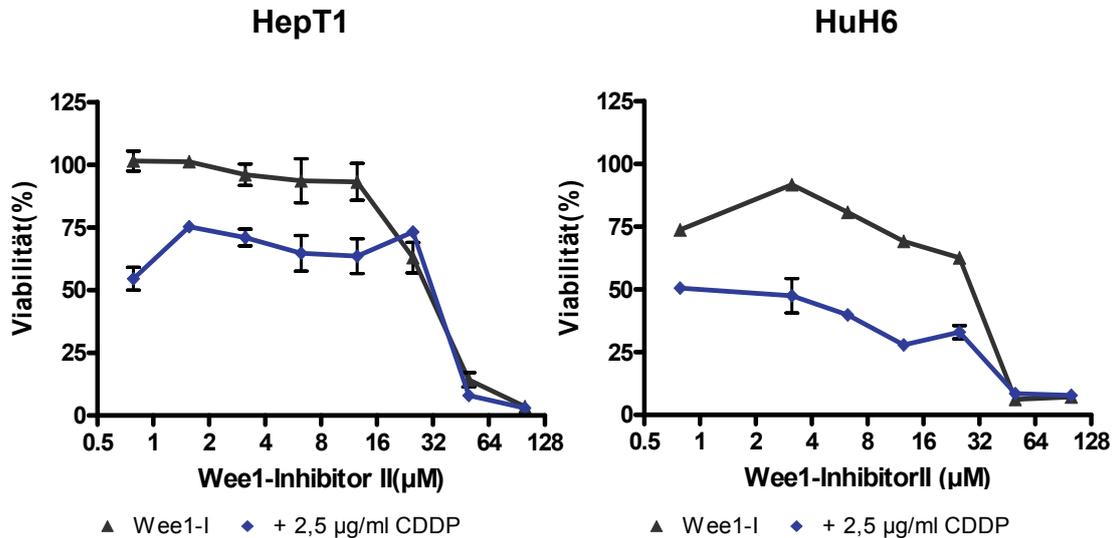


Abb. 5: Wirkung des Wee1-InhibitorsII auf die Viabilität von HB-Zellen. HuH6- und HepT1-Zellen wurden mit einer konstanten Konzentration von 2,5 µg/ml CDDP behandelt und mit aufsteigenden Konzentrationen von Wee1-I (0-100 µM) für 72 h inkubiert. Die relative Zellviabilität wurde im EZ4U Proliferationsassay bezogen auf eine unbehandelte Kontrolle bestimmt. Die Daten geben Mittelwerte und Standardabweichung von Triplikaten wieder.

Bei Betrachtung der Abb. 5 zeigt sich, dass bei der HepT1-Zelllinie die alleinige Inkubation mit 2,5 µg/ml CDDP zu einer Viabilität von ca. 60 % führt, es jedoch zu keiner gesteigerten Viabilitätshemmung in der Kombination mit dem Wee1-InhibitorII kommt. HuH6-Zellen reagierten deutlich sensibler auf CDDP, sodass bereits durch das Chemotherapeutikum eine mehr als halbmaximale Wachstumsinhibition erreicht wurde, jedoch trat auch bei dieser Zelllinie keine synergistische Wirkung zwischen den beiden Substanzen auf. Auffallend war, dass eine deutliche Viabilitätsreduzierung bei beiden Zelllinien in der Einzelbehandlung und in der Kombination erst ab einer Konzentration von mindestens 25 µM Wee1-I einsetzte.

3.1.3 Einfluss von VX-680 in Kombination mit CDDP auf die Proliferation von HB-Zellen

Genauso wie der Wee1-InhibitorII wurde VX-680 mit dem Chemotherapeutikum CDDP kombiniert und anschließend im Proliferationsassay untersucht, ob ein Kombinationseffekt in der Wirkung der beiden Substanzen besteht.

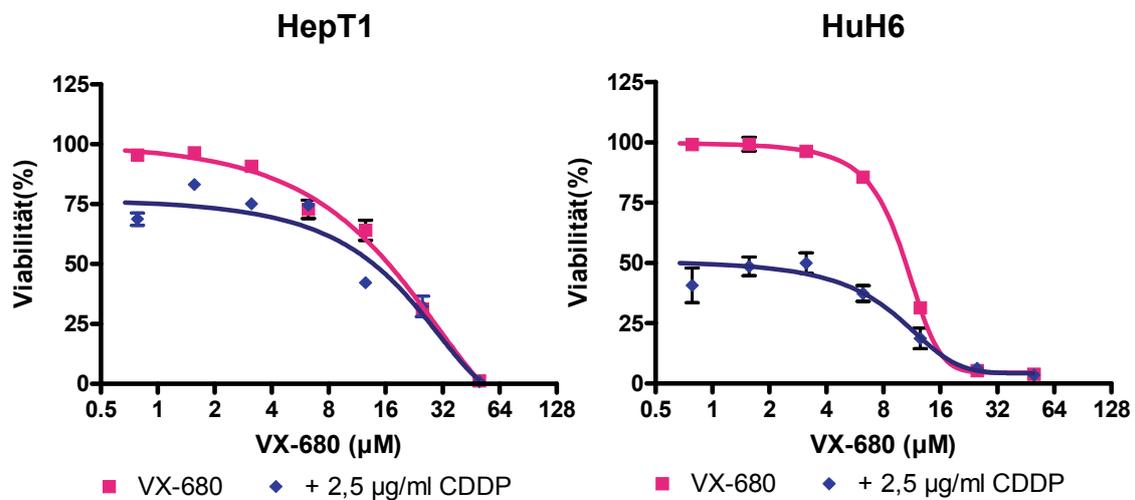


Abb. 6: Wirkung von VX-680 und CDDP auf die Viabilität von HB-Zellen. HuH6- und HepT1-Zellen wurden mit einer konstanten Konzentration von 2,5 µg/ml CDDP behandelt und mit aufsteigenden Konzentrationen von VX-680 (0-50 µM) für 72 h inkubiert. Die relative Zellviabilität wurde im EZ4U Proliferationsassay bezogen auf eine unbehandelte Kontrolle bestimmt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichung aus Triplikaten.

In den in Abb. 6 dargestellten Proliferationsassays konnte beobachtet werden, dass alle verwendeten Substanzen eine proliferationshemmende Wirkung auf die Zelllinien HuH6 und HepT1 hatten, und es wurde für alle Substanzen bzw. Kombinationen eine Konzentration erreicht, die zu einer Inhibition der Zellviabilität von mehr als 50 % führte. Unter der alleinigen Wirkung von 2,5 µg/ml CDDP wurde bei der HepT1-Zelllinie eine Proliferationshemmung von ca. 25 % erreicht, bei den HuH6-Zellen kam es bereits bei dieser Konzentration zu einer Hemmung von 50 %. Bei HepT1-Zellen war der IC₅₀-Wert in der

Kombination mit CDDP ($12,8 \pm 1,8 \mu\text{M}$) im Vergleich zur Einzelbehandlung mit VX-680 ($16,6 \pm 1,2 \mu\text{M}$) nur geringfügig niedriger. Die Kurven näherten sich im weiteren Verlauf bei ansteigenden Konzentrationen des Aurorakinase-Inhibitors an. Zwar konnte der IC_{50} -Wert der HuH6-Zelllinie in der Kombination nicht bestimmt werden, da bei einer Konzentration von $2,5 \mu\text{g/ml}$ CDDP bereits eine Viabilität von weniger als 50 % zu beobachten war, jedoch zeigte sich beim Vergleich der Kurven miteinander keine Proliferationshemmung, die über die Wirkung der Einzelsubstanzen hinausgeht. Die Wirkung von VX-680 setzte bei beiden Zelllinien sowohl in der Einzelbehandlung als auch in der Kombination zwischen $3 \mu\text{M}$ und $4 \mu\text{M}$ ein. Eine synergistische Wirkung der beiden Substanzen konnte nicht nachgewiesen werden.

3.1.4 Einfluss von VX-680 und SAHA auf die Proliferation von HB-Zellen

Da SAHA als Histon-Deacetylase-Inhibitor genauso wie der Aurorakinase-Inhibitor VX-680 eine Wirkung auf Histon H3-Proteine hat, wurde diese Kombination auch im Proliferationsassay untersucht. Zur Anwendung kamen verschiedene Konzentrationen von SAHA (0; 0,1; 0,2; 0,5 μM), die mit einer aufsteigenden Konzentrationsreihe von VX-680 (0-50 μM) kombiniert wurden. Wie in den vorangegangenen Versuchen wurde im EZ4U Proliferationsassay photometrisch der Einfluss auf die Zellviabilität bestimmt.

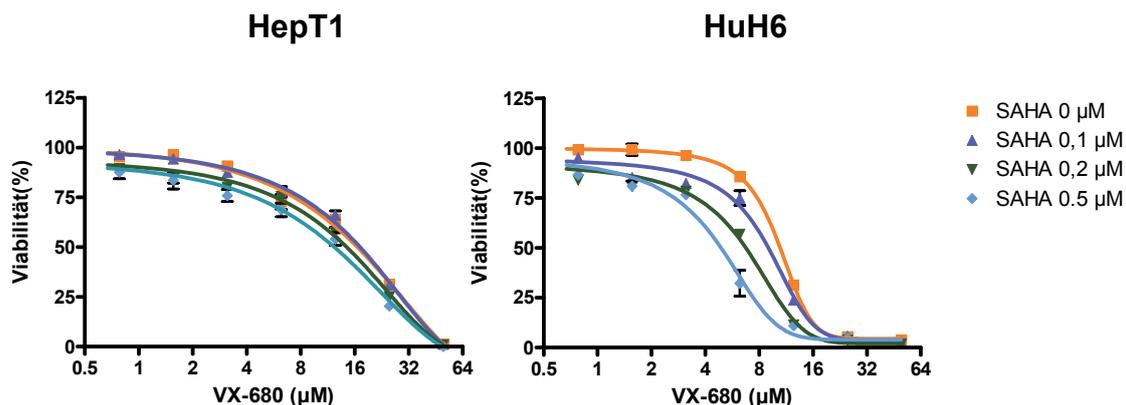


Abb. 7: Wirkung von VX-680 und SAHA auf die Proliferation von HepT1- und HuH6-Zellen. VX-680 wurde in aufsteigenden Konzentrationen (0-50 µM) in Kombination mit 0; 0,1; 0,2 oder 0,5 µM SAHA auf die Zelllinien gegeben und für 72 h inkubiert. Die relative Zellviabilität wurde im EZ4U Proliferationsassay bezogen auf eine unbehandelte Kontrolle bestimmt. Die Daten geben Mittelwerte und Standardabweichung von Triplikaten wieder.

In dem in Abb. 7 dargestellten Versuch konnte in allen vier Kombinationsvarianten bei den HepT1-Zellen eine Viabilitätsreduktion im Kurvenverlauf beobachtet werden. SAHA führte ab einer Konzentration von 0,2 µM zu einer leichten Reduktion der Viabilität um ca. 15 %. Die Kurven der verschiedenen Kombinationsbehandlungen verliefen sehr eng und parallel zueinander, so dass keine relevanten Unterschiede in den Behandlungen festzustellen waren. Für die Proben, die ohne SAHA inkubiert wurden, lag der durchschnittliche IC_{50} -Wert von VX-680 bei $16,6 \pm 1,2$ µM, für die Behandlung mit 0,5 µM SAHA konnte eine IC_{50} von $15,4 \pm 1,1$ µM bestimmt werden. Es zeigte sich, dass HuH6-Zellen sensitiver auf die Kombination VX-680 und SAHA reagierten als HepT1-Zellen. Der dargestellte Kurvenverlauf zeigt deutliche Unterschiede zwischen den Konzentrationsansätzen auf. Der alleinige Einfluss von SAHA auf die Viabilitätsreduktion von HuH6-Zellen war jedoch wie bei den HepT1-Zellen schwach ausgeprägt. Unter Einwirkung der maximalen Konzentration von 0,5 µM SAHA kam es lediglich zu einer Reduktion der Zellviabilität von ca. 20 %. Die IC_{50} -Werte der unterschiedlichen Behandlungsregime lagen für 0 µM SAHA bei $10 \pm 1,2$ µM, für 0,1 µM SAHA bei $9,3 \pm 1,0$ µM, für 0,2 µM SAHA bei $7,1 \pm 1,1$ µM und für 0,5 µM SAHA bei

5,2 ± 1,1 µM VX-680. Ein statistischer Vergleich der Kurven (F-Test) zeigte einen signifikanten Unterschied der IC₅₀ bei Behandlungen mit SAHA im Vergleich zu VX-680 allein (p < 0.05). Bei der höchsten eingesetzten Konzentration von SAHA konnte somit die IC₅₀ bei ca. der Hälfte der VX-680-Konzentration im Vergleich zur Behandlung ohne SAHA erreicht werden. Ebenso wie in den vorangegangenen Versuchen setzte die Wirkung von VX-680 bei beiden Zelllinien zwischen 3 µM und 4 µM ein. Im HuH6 Proliferationsassay konnte bei dieser Konzentration ein Abfallen der Kurven bei allen vier Behandlungen in Abhängigkeit von der Konzentration von SAHA verzeichnet werden. Die Beobachtung, dass HuH6-Zellen nur eine geringe Sensibilität gegenüber SAHA in der Einzelbehandlung aufweisen, und die Tatsache, dass die Kombinationsbehandlung in Abhängigkeit von der SAHA Konzentration zu einer gesteigerten Viabilitätshemmung führt, deutet auf eine synergistische Wirkung der beiden Substanzen hin.

Zusammengefasst zeigten die Versuche, dass SAHA als Einzelbehandlung auf die Proliferation von HepT1- und HuH6-Zellen nur einen geringen Einfluss hat. Während der Histon-Deacetylase Inhibitor bei HepT1-Zellen keinen wirkungssteigernden Effekt auf den Aurorakinase-Inhibitor zeigte, konnte bei HuH6-Zellen eine synergistische Wirkung der beiden Substanzen aufgezeigt werden.

3.2 Morphologische Veränderungen von HB-Zellen unter Behandlung von VX-680 und SAHA

Um zu untersuchen, ob die Langzeitexposition von VX-680 und SAHA zu morphologischen Veränderungen von HepT1 und HuH6 führt, wurden Petrischalen der beiden Zelllinien mit diesen Substanzen inkubiert und anschließend lichtmikroskopisch untersucht. Aus Vorversuchen wurde die Erkenntnis gewonnen, dass HB-Zellen unter Behandlung von 10 µM VX-680 (3.1.1) und 0,2 µM SAHA (3.1.4) nicht mehr proliferieren. Daher konnten Zellkulturen mit einer nahezu 100 %igen Konfluenz mit den genannten Konzentrationen in Einzel- und Kombinationsbehandlungen der beiden

Ergebnisse

Substanzen inkubiert werden. Nach 72 h Inkubation erfolgte ein Mediumwechsel und eine erneute Behandlung, nach weiteren 24 h (HuH6) bzw. 72 h (HepT1) fand die Untersuchung der Zellen statt. Die HuH6-Zelllinie musste bereits nach insgesamt 96 h untersucht werden, da nach diesem Zeitraum der Zellrasen bereits sehr licht war und nur noch wenige Zellen lebten. In Abb. 8 ist die lichtmikroskopische Darstellung beider Zelllinien nach Langzeitinkubation zu sehen. Da bei Betrachtung der Zellen nach 24 h keine Veränderungen zu verzeichnen war, jedoch eine Veränderung der Zellkerne beobachtet werden konnte, wurden diese nach 24 h untersucht und in DAPI Kernfärbung die Durchmesser bestimmt (Abbildung nicht dargestellt).

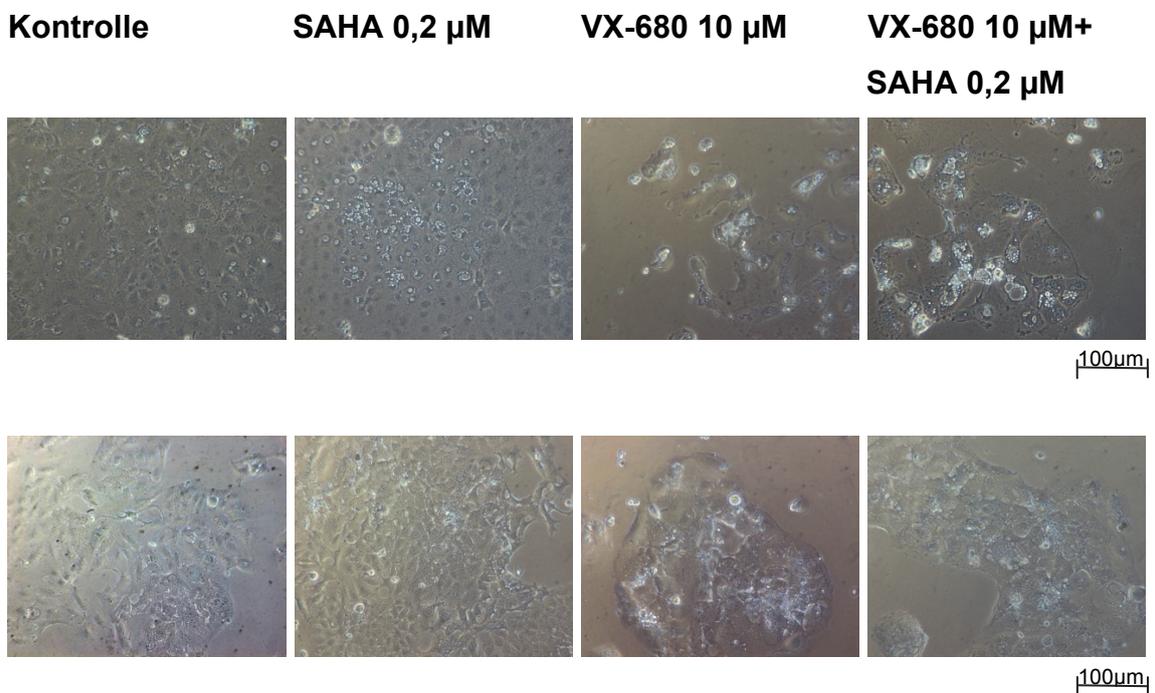


Abb. 8: Lichtmikroskopische Darstellung von HB-Zellen unter verschiedenen Behandlungen mit VX-680 und SAHA. Oben: HuH6-Zellen nach 72 h + 24 h Inkubationszeit. Unten: HepT1-Zellen nach 72 h + 72 h Inkubationszeit.

Bei lichtmikroskopischer Betrachtung der Kulturen (Abb. 8) ließ sich eine sichtbare Abnahme der Zellpopulation unter allen Behandlungen beobachten. Der alleinige Einfluss von SAHA führte zu einem leichten Rückgang der Konfluenz, wogegen unter Monotherapie mit VX-680 und unter

Kombinationstherapie ein starker Rückgang des Zellrasens aufgezeigt werden konnte. Unter Einwirkung von 0,2 μM SAHA traten vereinzelt Vakuolen in den Zellen auf und in der Petrischale wurden mehr tote Zellen im Vergleich zur Kontrolle festgestellt. Im Zellzusammenhalt und in der Zellform waren jedoch keine Unterschiede evident. In den Schalen, die mit 10 μM VX-680 und mit der Kombination inkubiert wurden, nahm die Anzahl an Vakuolen weiter zu, und es traten auch vermehrt tote Zellen auf. Die Zellen nahmen eine runde Form an und wuchsen in inselartigen Zellverbänden. Die Wirkung von VX-680 und SAHA auf die Morphologie von HB-Zellen war für beide Zelllinien sehr ähnlich und sowohl lichtmikroskopisch (Abb. 8) als auch in der DAPI Kernfärbung war eine Größenzunahme der Zellen und Zellkerne bei beiden Zelllinien zu beobachten. Es wurden jeweils 10 Zellen und 10 Zellkerne zufällig ausgewählt und die Durchmesser bestimmt. Der Mittelwert und die Standardabweichung wurden in einem Balkendiagramm dargestellt (Abb. 9).

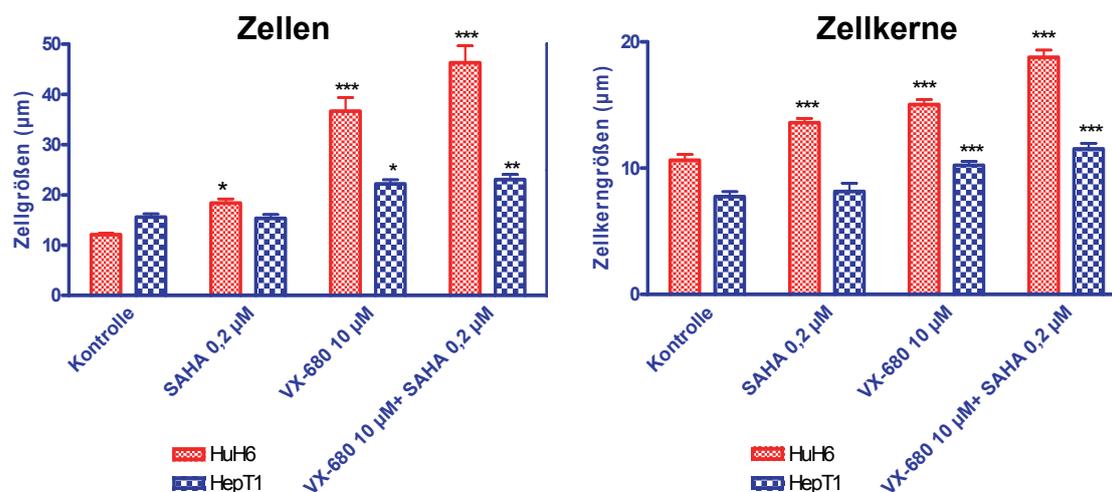


Abb. 9: Größenveränderung der Durchmesser (μm) von Zellen und Zellkernen der Zelllinien HepT1 (blau) und HuH6 (rot) unter Behandlung mit VX-680 und SAHA. Die Auswertung der Zellen erfolgte nach 72 h + 72 h (HepT1) bzw. nach 72 h + 24 h (HuH6), die der Zellkerne nach 24 h. Die Daten geben die Mittelwerte und Standardabweichung von 10 Messwerten wieder (Two-way ANOVA, Bonferroni test * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$; *** $p < 0,001$ im Vergleich zur Kontrolle).

In Abb. 9 zeigt sich, dass durch die alleinige Behandlung mit 0,2 μM SAHA kein Größenzuwachs bei der HepT1-Zelllinie auftrat. Bei Betrachtung der Zellen, die mit VX-680 und der Kombinationsbehandlung inkubiert wurden, war allerdings eine signifikante Größenzunahme des Zell- und des Zellkerndurchmessers im Vergleich zur Kontrolle zu verzeichnen. In der Kombinationstherapie steigerte sich jedoch der Durchmesser der Zellen nach Langzeitinkubation und der Durchmesser der Zellkerne nach 24 h, verglichen mit der Monobehandlung mit VX-680, nur geringfügig (nicht signifikant). Bei HuH6-Zellen war eine signifikante Größenzunahme der Zell- und Zellkerndurchmesser bereits bei der Monobehandlung mit 0,2 μM SAHA festzustellen. Der Größenzuwachs fiel in der Behandlung mit VX-680 noch relevanter aus, und auch in der Kombinationsbehandlung nahm der Durchmesser von Zellen und Zellkernen signifikant im Vergleich zur Kontrolle und zur Monobehandlung mit VX-680 weiter zu. Bei einer Konzentration von 10 μM VX-680 und 0,2 μM SAHA steigerte sich der Durchmesser von HepT1-Zellen um das 1,5-fache, der Durchmesser von HuH6-Zellen nahm unter den gleichen Konzentrationen sogar um mehr als das 4-fache im Vergleich zur Kontrolle zu.

Zusammenfassend lässt sich sagen, dass VX-680 bei beiden Zelllinien zu einem signifikanten Größenzuwachs der Zellen und Zellkerne führte. Unter Behandlung des Histon-Deacetylase-Inhibitors SAHA kam es sowohl in der Einzelbehandlung im Vergleich zur Kontrolle als auch in der Kombinationsbehandlung im Vergleich zur Inkubation mit VX-680 nur bei der HuH6-Zelllinie zu einer signifikanten Größenzunahme der Zellen und Zellkerne.

3.3 Apoptoseinduktion von VX-680 und SAHA in HB-Zellen

Der beobachtete Zelltod in der Zellkultur nach Inkubation mit VX-680 kann entweder durch den programmierten Zelltod (Apoptose), Nekrose oder Autophagie entstehen. Um zu überprüfen, ob es durch VX-680 zur Induktion der Apoptose in HB-Zellen kommt, wurde unter Verwendung von NucView 488 die aktive Caspase-3 als Surrogat für die Apoptose dargestellt. Um zusätzlich einen eventuellen proapoptischen Effekt von SAHA zu untersuchen, wurden beide

Ergebnisse

Substanzen in Einzel- und Kombinationsbehandlungen für 24 h mit HuH6- und HepT1-Zellen inkubiert. Aufgrund der unterschiedlichen IC_{50} -Werte für HuH6- und HepT1-Zellen kamen verschiedene Konzentrationen von VX-680 zum Einsatz.

Das nicht fluoreszierende Substrat von Caspase 3 (NucView 488) wird in apoptotischen Zellen durch die Aktivierung von Caspasen in ein fluoreszierendes Produkt umgesetzt. Durch die grüne Fluoreszenz ließen sich indirekt die apoptotischen Zellen darstellen.

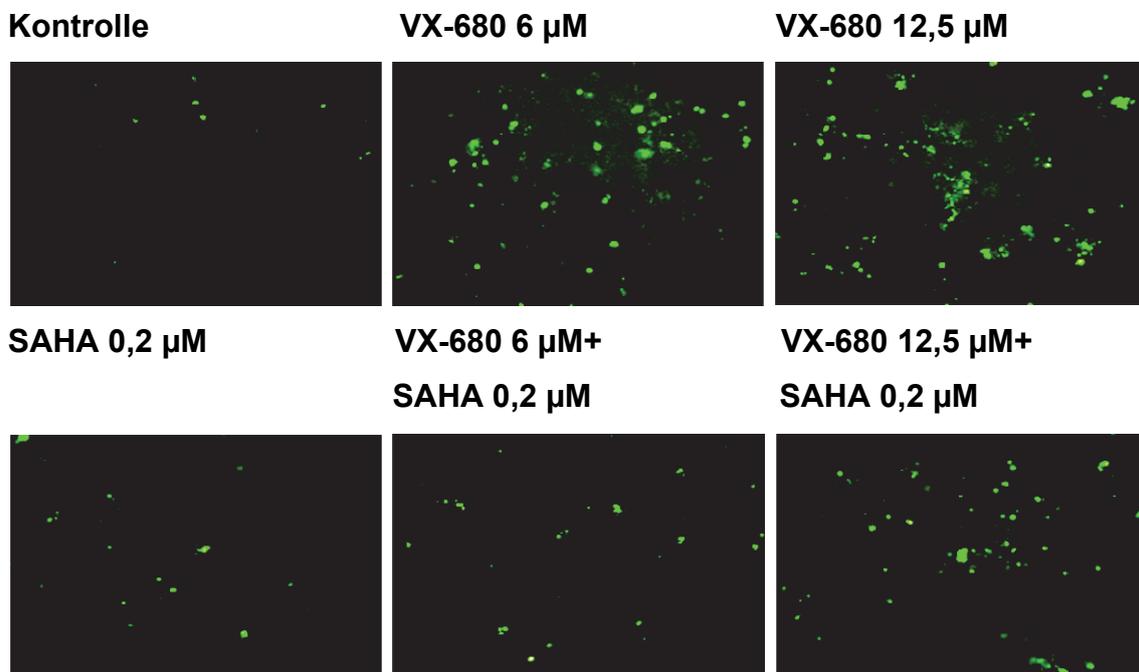


Abb. 10: Induktion der Apoptose in HuH6-Zellen nach Behandlung mit VX-680 und SAHA. Die Zellen wurden mit Inhibitoren 24 h inkubiert, mit dem Caspase 3-Substrat NucView488 gefärbt und durch Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet. Grün leuchtende Zellen befinden sich in der Apoptose.

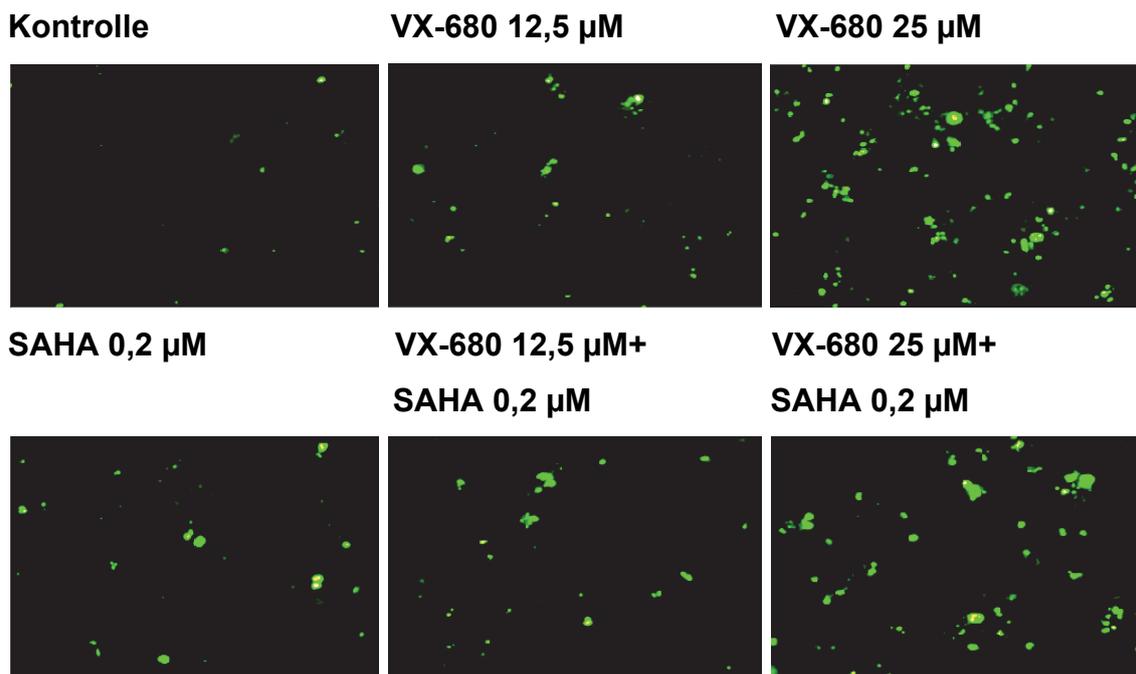


Abb. 11: Induktion der Apoptose in HepT1-Zellen nach Behandlung mit VX-680 und SAHA. Die Zellen wurden mit Inhibitoren 24 h inkubiert, mit dem Caspase 3-Substrat NucView488 gefärbt und durch Fluoreszenzmikroskopie ausgewertet. Grün leuchtende Zellen befinden sich in der Apoptose.

Bei Betrachtung der Abb. 10 und 11 fällt auf, dass im Vergleich zu den Kontrollproben von HepT1 und HuH6, bei denen nur ein schwaches Fluoreszenzsignal zu verzeichnen ist, die Anzahl an apoptotischen Zellen in allen anderen Versuchsansätzen zunimmt. Die verwendete Konzentration von SAHA führte bei beiden Zelllinien nur zu einer schwachen Induktion der Apoptose, und auch die proapoptotische Wirkung von VX-680 an HepT1-Zellen, die mit einer Konzentration von 12,5 μ M inkubiert wurden, wies nur eine geringe Differenz zu den Proben auf, die einer Behandlung mit 0,2 μ M SAHA ausgesetzt waren. Mit einer Erhöhung der Konzentration auf 25 μ M steigerte sich die Anzahl an apoptotischen Zellen jedoch um deutlich mehr als das Doppelte. HuH6-Zellen reagierten merklich sensitiver auf VX-680 und es konnte bereits bei 6 μ M eine starke Apoptoseinduktion konstatiert werden. Bei einer Konzentrationserhöhung auf 12 μ M steigerte sich die Anzahl apoptotischer Zellen, eine Verdopplung im Vergleich zu den Proben, die mit 6 μ M inkubiert wurden, war jedoch nicht evident. In den Kombinationsbehandlungen mit

SAHA, die mit jeweils zwei verschiedenen Konzentrationen von VX-680 inkubiert wurden, zeigte sich bei beiden Zelllinien im Vergleich zu den Einzelbehandlungen mit VX-680 keine Steigerung der Apoptoseinduktion. Zusammenfassend konnte sowohl für SAHA als auch VX-680 eine Induktion der Apoptose beobachtet werden, wobei VX-680 eine stärkere proapoptische Induktion als SAHA aufwies. Im Vergleich der Kulturen zueinander zeigte sich, dass HuH6-Zellen deutlich sensitiver auf den Aurorakinase-Inhibitor reagierten als HepT1-Zellen. Eine gesteigerte Apoptoseinduktion in den Kombinationsbehandlungen verglichen mit den Einzelbehandlungen von VX-680 konnte für keine Zellkultur evaluiert werden.

3.4 Einfluss von VX-680 und SAHA auf die Phosphorylierung und Acetylierung von Histon H3-Proteinen in HB-Zellen

3.4.1 Veränderung der Phosphorylierung in der Immunfluoreszenzdarstellung

Um den Einfluss von VX-680 und SAHA auf die Phosphorylierung von Histon H3-Proteinen in HB-Zellen zu untersuchen, wurden HuH6- und HepT1-Zellen jeweils mit 0,2 μM SAHA, 10 μM VX-680 und einer Kombination aus 0,2 μM SAHA und 10 μM VX-680 behandelt. Zur Anwendung kam ein Anti-Phospho-Histon H3 (Serin 10) Ak, der spezifisch an phosphoryliertem Serin an der Position 10 von Histon H3 bindet. Die Versuchsansätze wurden nach der Behandlung für 24 h inkubiert und anschließend unter einem Fluoreszenzmikroskop untersucht.

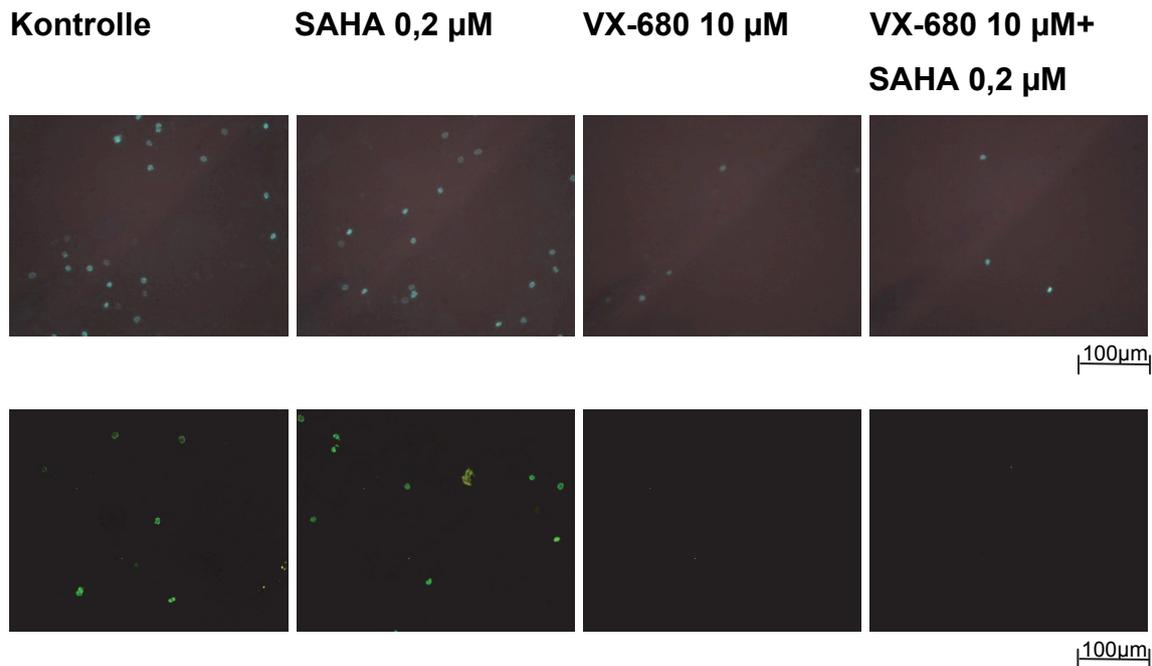


Abb. 12: Phosphorylierung von Histon H3 in HB-Zellen: HepT1 (obere Reihe) und HuH6-Zellen (untere Reihe) wurden mit Inhibitoren für 24 h inkubiert. Immunfluoreszenzanalysen mit Anti-Phospho-Histon H3 (Serin10) und FITC Anti-Maus IgG zeigen wenige grüne Zellen mit phosphorylierten Histon-Proteinen. Unter Einfluss von VX-680 nimmt die Anzahl der Zellen mit phosphorylierten Serinresten an Histon H3 stark ab.

Bei beiden Zelllinien war das Fluoreszenzsignal in der Kontrolle (Abb.12) nicht sehr stark ausgeprägt, jedoch waren deutlich grün fluoreszierende Zellen in beiden Kontrollproben zu erkennen. Während in den Proben, die mit 0,2 μ M SAHA inkubiert wurden, bei beiden Zelllinien kein merklicher Rückgang der Fluoreszenz zu verzeichnen war, zeigte sich eine deutliche Abnahme der Histon H3-Phosphorylierung in den Versuchsansätzen, die mit VX-680 behandelt wurden. Bei HepT1-Zellen waren nach 24 h Behandlung mit 10 μ M VX-680 und in der Kombination mit 0,2 μ M SAHA nur noch sehr wenige fluoreszierende Zellen zu sehen. Auf HuH6-Zellen wirkte VX-680 so stark, dass sowohl in der Monobehandlung als auch in der Kombination keine fluoreszierenden Zellen mehr beobachtet werden konnten. Bei beiden Zelllinien war somit eine Reduzierung von phosphoryliertem Histon H3 unter Behandlung von VX-680 bei einer Konzentration von 10 μ M nachweisbar. Der Histon-

Deacetylase-Inhibitor SAHA zeigte hingegen keinen Einfluss auf die Phosphorylierung von Histon H3 an Serin 10.

3.4.2 Veränderung der Phosphorylierung in der FACS-Analyse

Wie in Versuch 3.4.1 wurden beide Zelllinien mit den gleichen Wirkstoffen und Konzentrationen für 24 h behandelt. Nach der Inkubationszeit wurde der Anti-Phospho-Histon H3 (Serin 10) Antikörper in die Proben gegeben und anschließend in einer FACS-Analyse der prozentuale Anteil von phosphorylierten Serinresten an Histon H3-Proteinen in den einzelnen Proben bestimmt.

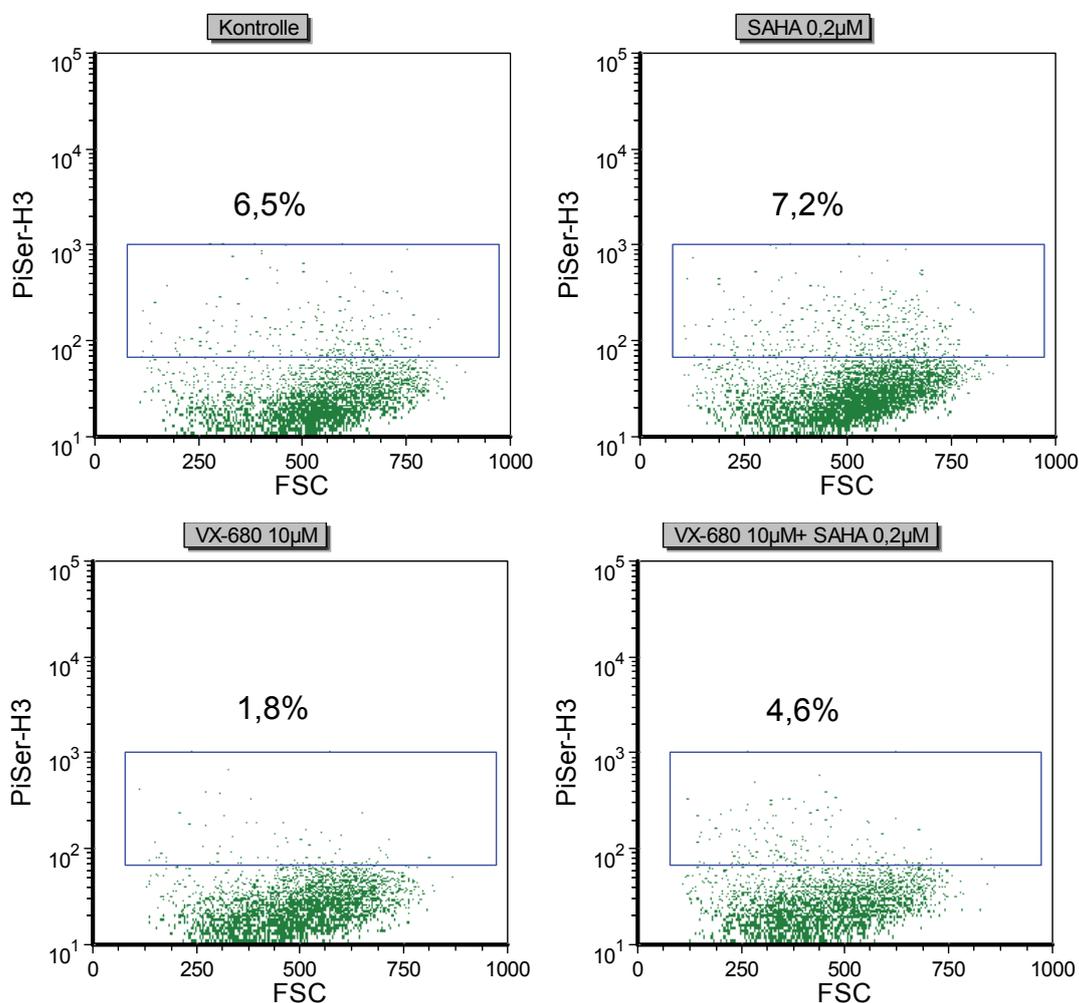


Abb. 13: Histonphosphorylierung in HuH6-Zellen. Die durchflusszytometrische Analyse mit Anti-Phospho-Histon H3 (Serin 10) wurde in HuH6-Zellen nach 24 h Inkubation mit VX-680 und SAHA durchgeführt. Das Fenster gibt den prozentualen Anteil der HB-Zellen mit phosphorylierten Serinresten an Histon H3 an.

Auch in der FACS-Analyse (Abb. 13) war ersichtlich, dass mit VX-680 inkubierte HuH6-Zellkulturen eine geringere Phosphorylierung von Serinresten an Histon H3 aufweisen. Der Anteil an positiven Zellen sank von 6,5 % in der Kontrolle auf 1,8 % in der Einzelbehandlung mit 10 μ M VX-680. In den Versuchsansätzen mit SAHA steigerte sich die Menge an positiven Zellen auf 7,2 % und auch in der Kombinationsbehandlung waren mit 4,6 % deutlich mehr Phospho-Histon H3 (Serin 10)-positive Zellen vorhanden als unter der Einzelbehandlung mit 10 μ M VX-680 (1,8 %). Bei HepT1-Zellen konnte zwar unter allen Inkubationsansätzen eine Abnahme konstatiert werden, jedoch wurden in der Kontrolle lediglich 2,8 % Zellen detektiert, die phosphoryliertes Serin an Position 10 von Histon H3 aufwiesen. Somit kann dieser Versuch keine starke Aussagekraft über den Einfluss von SAHA und VX-680 auf HepT1-Zellen liefern (Daten nicht dargestellt). Es war auffällig, dass entgegen der Ergebnisse in Abschnitt 3.4.1 HuH6-Zellen in der FACS-Analyse mehr Histon H3 (Serin 10)-positive Zellen aufwiesen als HepT1-Zellen.

3.4.3 Veränderung von Phosphorylierung und Acetylierung von Histon H3-Proteinen im Western Blot.

HepT1- und HuH6-Zellen wurden wie in Versuch 3.4.1 und 3.4.2 mit den gleichen Wirkstoffen und Konzentrationen für 24 h inkubiert. Anschließend wurden durch Zellyse und Western Blot untersucht, ob sich die in den Zellen befindlichen Histon H3-Proteine in ihrem Phosphorylierungs- bzw. Acetylierungsgrad im Vergleich zur Kontrolle verändert hatten.

3.4.3.1 Wirkung von VX-680 und SAHA auf die Phosphorylierung von Histon H3-Proteinen

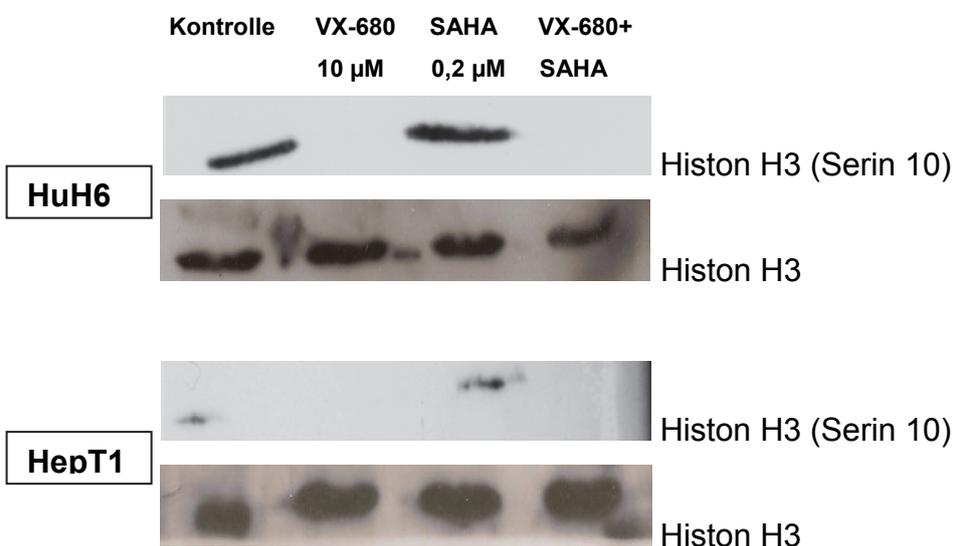


Abb.14: Phosphorylierung von Histon H3 an Serin 10 nach Exposition von HB-Zellen zu VX-680 und SAHA. HuH6- und HepT1-Zellen wurden mittels Western Blot nach 24 h Inkubation mit 10 µM VX-680 und 0,2 µM SAHA untersucht. Die Beladung der Gele wurde mit dem Anti-Histon-H3 Ak auf parallel laufenden Ansätzen überprüft. Alle dargestellten Banden erschienen bei ca. 15 Kilodalton. Die H3-Phosphorylierung an Serin 10 nimmt in den Proben mit VX-680 Behandlung ab (2 min Belichtung).

Bei Betrachtung der Western Blot-Analyse (Abb. 14) mit Anti-Phospho-Histon H3 (Serin 10) Antikörper zeigten sich Banden bei ca. 15 Kilodalton (kDa). Da Histon-Proteine sich bei ca. 15 kDa befinden, konnte davon ausgegangen werden, dass der Antikörper an diese bindet. Da keine weiteren Banden auf den Gelen ersichtlich waren, wurde außerdem eine spezifische Bindung des Antikörpers an Histon H3-Proteine angenommen. Bei der HuH6-Zelllinie traten starke Banden bei 15 kDa in der Kontrolle und bei der Behandlung mit SAHA auf. Durch die Exposition mit 10 µM VX-680 und in der Kombinationsbehandlung mit 0,2 µM SAHA waren keine Banden mehr ersichtlich, was auf eine komplette Dephosphorylierung an Serin 10 hindeutet. Bei den HepT1-Zellen war der gleiche Effekt zu beobachten, jedoch erschienen

die Banden in der Kontrollbehandlung und in der Behandlung mit SAHA deutlich schwächer als bei HuH6.

3.4.3.2 Wirkung von VX-680 und SAHA auf die Acetylierung von Histon H3-Proteinen

Um die Veränderung der Acetylierung von Histon-Proteinen unter dem Einfluss von SAHA zu untersuchen, wurden vier verschiedene an Lysinreste von Histon H3 bindende Antikörper verwendet: Anti-Acetyl-Histone H3 (Lysin 9), Anti-Acetyl-Histon H3 (Lysin 18), Anti-Acetyl-Histon H3 (Lysin 23) und ein genereller Anti-Acetyl-Histon H3-Antikörper. Beide Zelllinien wurden entweder mit 0,2 μM SAHA, 10 μM VX-680 oder einer Kombination aus beiden Substanzen für 24 h inkubiert. Von den vier an Acetyl-Histon bindenden Antikörpern war nur das Signal von Anti-Acetyl-Histon H3 (Lysin 18) und des generellen Anti-Acetyl-Histon H3 Antikörpers stark genug, jedoch ließen sich im Western Blot-Verfahren keine Unterschiede in der Intensität und Größe der Banden in Abhängigkeit von der Behandlung feststellen (Daten nicht dargestellt). Um die alleinige Wirkung von SAHA besser zu untersuchen, wurden beide Zelllinien zusätzlich mit einer aufsteigenden Konzentrationsreihe von SAHA (0; 0,4; 0,8; 1,2; 1,6; 2 μM) für 24 h inkubiert und unter Verwendung des Anti-Acetyl-Histon H3 Ak auf die Acetylierung an Histon H3 untersucht.

Ergebnisse

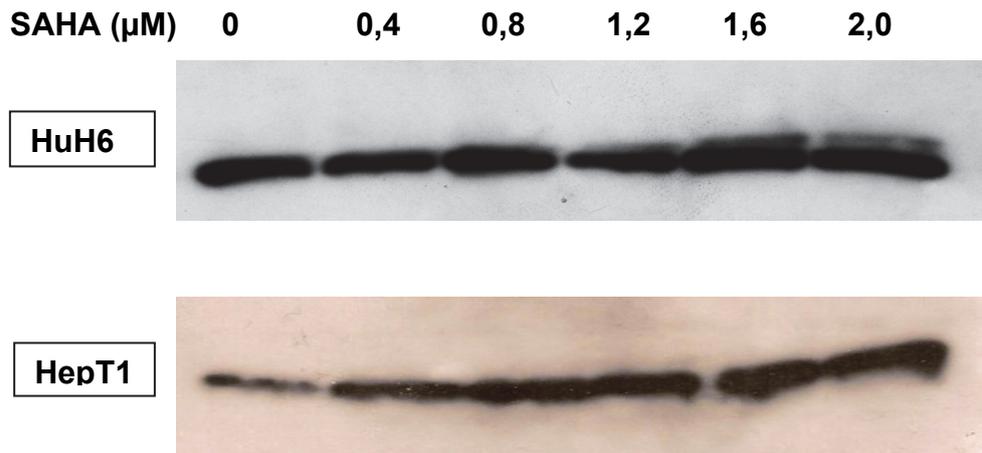


Abb. 15: Acetylierung von Histon H3 in HB-Zellen. Western Blot-Analyse von HuH6- und HepT1-Zellen mit Anti-Acetyl-Histon H3 Ak nach 24 h Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von SAHA. Bei HepT1-Zellen kommt es durch steigende Konzentrationen von SAHA zur Zunahme der Acetylierung an Histon H3. Die Exposition des Films zu Chemolumineszenz dauerte 2 min.

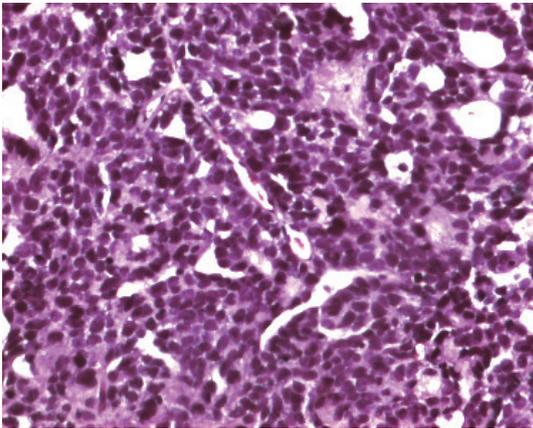
In Abb. 15 konnten für alle verschiedenen Behandlungen starke Banden bei 15 kDa registriert werden. Bei der HuH6-Zelllinie war bereits eine sehr starke Acetylierung in der Kontrollbehandlung vorhanden, die sich unter Einfluss von SAHA nicht maßgeblich änderte. HepT1-Zellen zeigten hingegen in den Kontrollproben einen deutlich geringeren Acetylierungsgrad und es konnte konzentrationsabhängig von SAHA ab einer Konzentration von 0,4 μM eine Zunahme von acetyliertem Histon H3 konstatiert werden.

Zusammenfassend wurde mit Immunfluoreszenz, FACS-Analyse und der Western Blot-Methode aufgezeigt, dass VX-680 einen hemmenden Einfluss auf die Phosphorylierung von Histon H3 hat. Eine gesteigerte Dephosphorylierung konnte hingegen weder unter der Monobehandlung mit SAHA noch unter der Kombinationsbehandlung mit VX-680 beobachtet werden. Es zeigte sich sowohl in der FACS-Analyse als auch bei der Western Blot-Methode, dass HepT1-Zellen in den Kontrollansätzen deutlich weniger phosphorylierte Histon H3-Proteine aufweisen als HuH6-Zellen. Hinsichtlich der Acetylierung an Histon H3 stellten sich in den Kontrollproben der HuH6-Zellen stärkere Banden als in den Kontrollproben der HepT1-Zellen dar. Konzentrationsabhängig von SAHA war eine Zunahme der Acetylierung nur bei HepT1-Zellen evident.

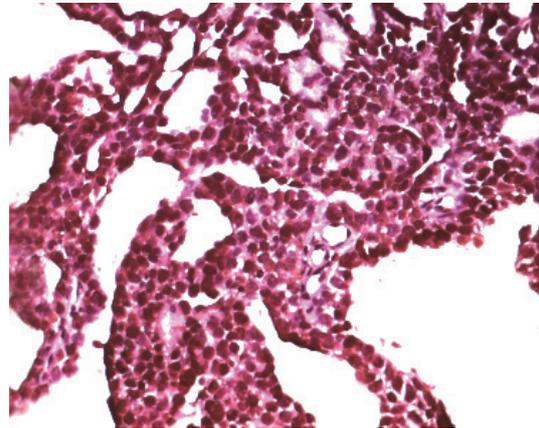
3.5 Histonmodifikation in HB-Gewebe

Um zu überprüfen, ob eine Phosphorylierung bzw. Acetylierung an Histon H3-Proteinen in HB-Geweben vorhanden ist, wurden HB-Gewebeschnitte immunhistochemisch mit Anti-Phospho-Histon H3 (Serin 10)- bzw. mit Anti-Acetyl-Histon H3-Antikörpern untersucht. Die Färbung erfolgte sowohl an Paraffinschnitten aus asservierten Xenotransplantaten (Kontrollgruppe des Tierversuchs K5/10) der Zelllinien HuH6 und HepT1, als auch an HB-Gefrierschnitten, die aus Patientengeweben gewonnen wurden.

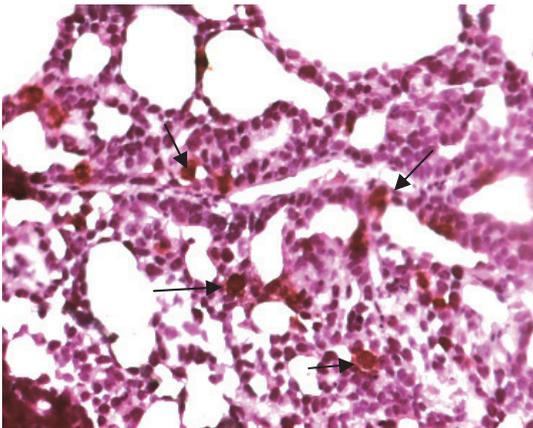
Negativkontrolle



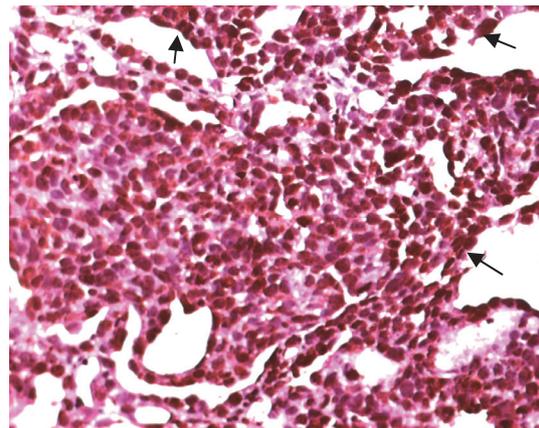
Histon H3



Phospho-Histon H3 (Serin10)



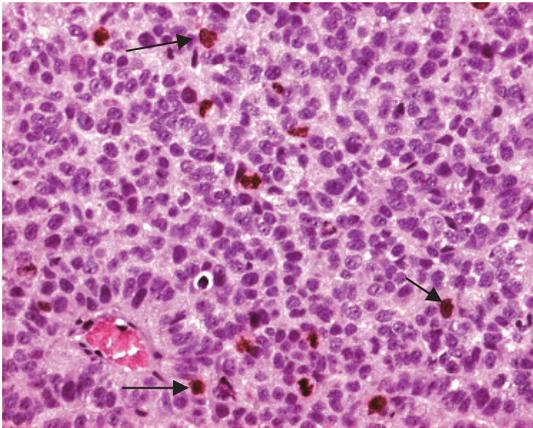
Acetyl-Histon H3



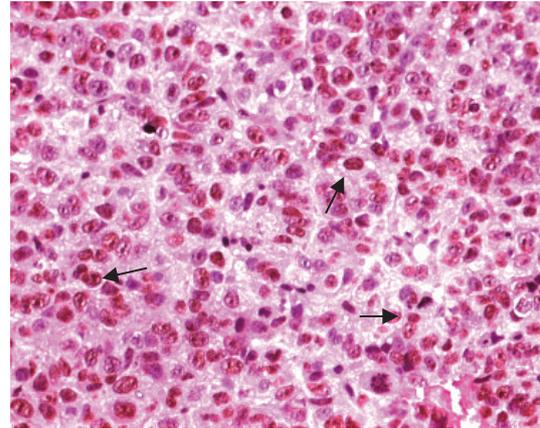
50µm

Abb. 16: Histonmodifikation bei HuH6-Geweben. Paraffinschnitte von Xenotransplantaten generiert aus HuH6-Zellen wurden immunhistochemisch untersucht. Histon H3, Phospho-Histon H3 (Serin 10) und Acetyl-Histon H3-positive Zellen erscheinen braun. Die Pfeile in den unteren beiden Bildern deuten auf braun gefärbte Zellen.

Phospho-Histon H3 (Serin10)



Acetyl-Histon H3



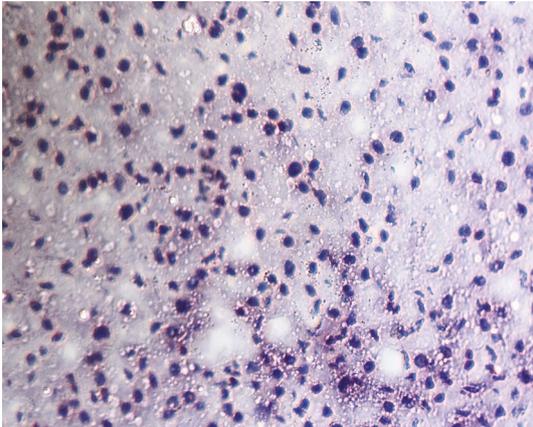
50µm

Abb. 17: Histonmodifikation bei HepT1-Geweben. Paraffinschnitte von Xenotransplantaten generiert aus HepT1-Zellen wurden immunhistochemisch untersucht. Phospho-Histon H3 (Serin 10)- und Acetyl-Histon H3-positive Zellen erscheinen braun. Die Pfeile deuten auf braun gefärbte Zellen.

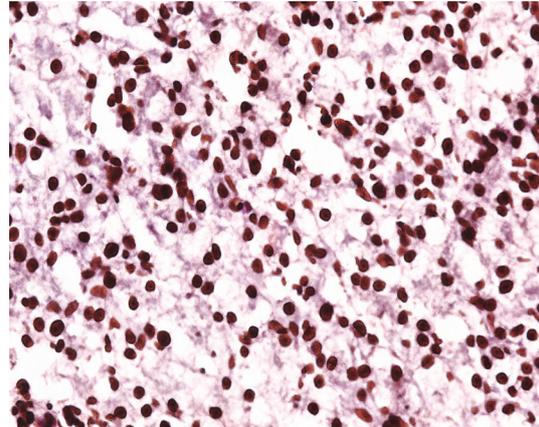
In der Kontrolle, die unter Abwesenheit des Primärantikörpers durchgeführt wurde, kam es zu keiner Farbreaktion, so dass Lila angefärbte Zellen als negativ anzusehen waren. In der Positivkontrolle konnte unter Verwendung des Anti-Histon H3 Ak. ein Farbumschlag in nahezu jeder Zelle hin zu einem braunen Farbton beobachtet werden (Negativ- und Positiv-Kontrolle für HepT1 nicht dargestellt). In der immunhistochemischen Untersuchung zeigten sich sowohl bei HuH6- als auch bei HepT1-Gewebeschnitten vereinzelt Phospho-Histon H3 (Serin 10)-positive Zellen. Bei beiden Zelllinien war zudem eine große Anzahl an Acetyl-Histon H3-positiven Zellen evident. Während bei dem HuH6-Gewebe kein Unterschied zwischen der Positivkontrolle und der Färbung mit Anti-Acetyl-Histon H3 zu sehen war, konnten bei dem HepT1-Gewebe noch vereinzelt negative Zellen ausgemacht werden.

Bei Betrachtung der zwei Gewebetypen ließen sich keine deutlichen Unterschiede in der Menge der Phosphorylierung zwischen HuH6- und HepT1-Geweben feststellen, jedoch zeigte sich, dass das HuH6-Gewebe eine noch stärkere Acetylierung als das HepT1-Gewebe aufwies.

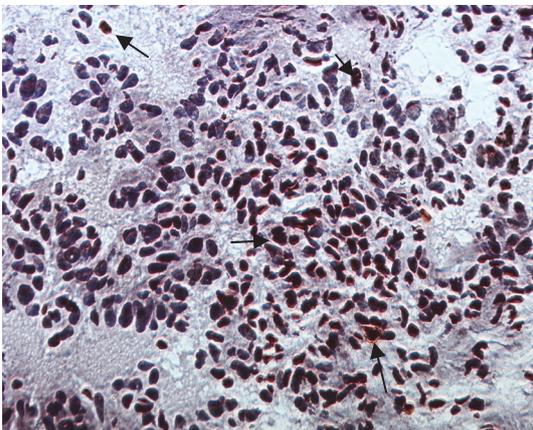
Negativkontrolle



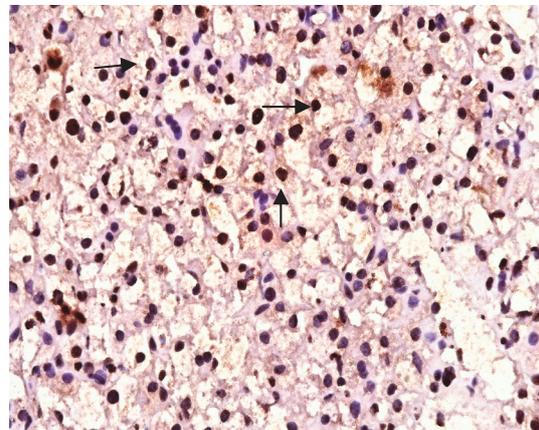
Histon H3



Phospho-Histon H3 (Serin10)



Acetyl-Histon H3



|50µm|

Abb. 18: Histonmodifikation bei Hepatoblastomgewebe (gemischter Typ). Gefrierschnitte von humanen primären Hepatoblastomen wurden immunhistochemisch untersucht. Histon H3,- Phospho-Histon H3 (Serin 10)- und Acetyl-Histon H3-positive Zellen erscheinen braun. Die Pfeile in den unteren beiden Bildern deuten auf braun gefärbte Zellen.

In den in Abb. 18 dargestellten HB-Geweben vom gemischten Typ waren in der Negativkontrolle keine braun gefärbten Zellen zu sehen, in der Positivkontrolle unter Verwendung des Anti-Histon-H3 Ak konnte hingegen eine deutliche Braunfärbung aller Zellen beobachtet werden. Es konnte bei einigen Zellen eine Phosphorylierung und bei deutlich mehr Zellen eine Acetylierung von Histon H3-Proteinen konstatiert werden.

Zusammenfassend ließen sich sowohl in Kryopräparaten als auch in Paraffinschnitten phosphorylierte Serinreste an Histon H3 nachweisen. Die

Phosphorylierung von Histon H3-Proteinen schien jedoch bei Patientengewebe stärker als bei den Mauspräparaten ausgeprägt zu sein. Eine sehr starke Acetylierung an Histon H3 zeigte sich bei allen untersuchten Präparaten, wobei die Anzahl an Histon-Acetyl H3-positiven Zellen bei den aus Mäusen gewonnenen HuH6-Gewebe am stärksten war.

3.6 Veränderung der Expression von Tumorstammzellmarkern unter Behandlung mit VX-680 und SAHA

Es wurde ermittelt, ob sich die Expression von vermuteten Tumorstammzellmarkern in HB-Zellkulturen unter Behandlung mit VX-680 und SAHA verändert. Zur Durchführung dieser Versuche wurden die Antikörper W4A5, W6B3C1, W5D3 und HEK-6D6 verwendet und durchflusszytometrisch untersucht. Diese Antikörper reagieren mit Oberflächenmarkern einer Subpopulation von mesenchymalen Stammzellen und neuronalen Progenitorzellen. Sie wurden von der AG Bühring freundlicherweise zur Verfügung gestellt (Dr. Bühring Medizinische Klinik II, UKT, persönliche Angaben).

In Vorversuchen wurde ermittelt, dass bei Konzentrationen von 10 μ M VX-680 (3.1.1) und 0,2 μ M SAHA (3.1.4) keine Zellproliferation bei HepT1- und HuH6-Zellen mehr stattfindet. Daher konnten Petrischalen mit nahezu 100 % konfluentem Zellrasen mit 0,2 μ M SAHA, 10 μ M VX-680 und der Kombination behandelt werden.

Nach 72 h wurde ein Mediumwechsel durchgeführt, die Zellen erneut behandelt und anschließend inkubiert, nach weiteren 24 h (HuH6) bzw. 72 h (HepT1) erfolgte die Markierung mit Antikörpern und die anschließende FACS-Analyse. Durch die Langzeitbehandlung waren nur noch wenige Zellen am Leben. An diesen Zellen wurde untersucht, ob sie sich im Expressionsverhalten von stammzelltypischen Oberflächenmarkern im Vergleich zur Kontrolle unterscheiden würden. Für HEK-6D6 und W4A5 konnte in der FACS-Analyse

eine Subpopulation und eine spezifische Bindung beobachtet werden, nicht hingegen für W6B3C1 und W5D3.

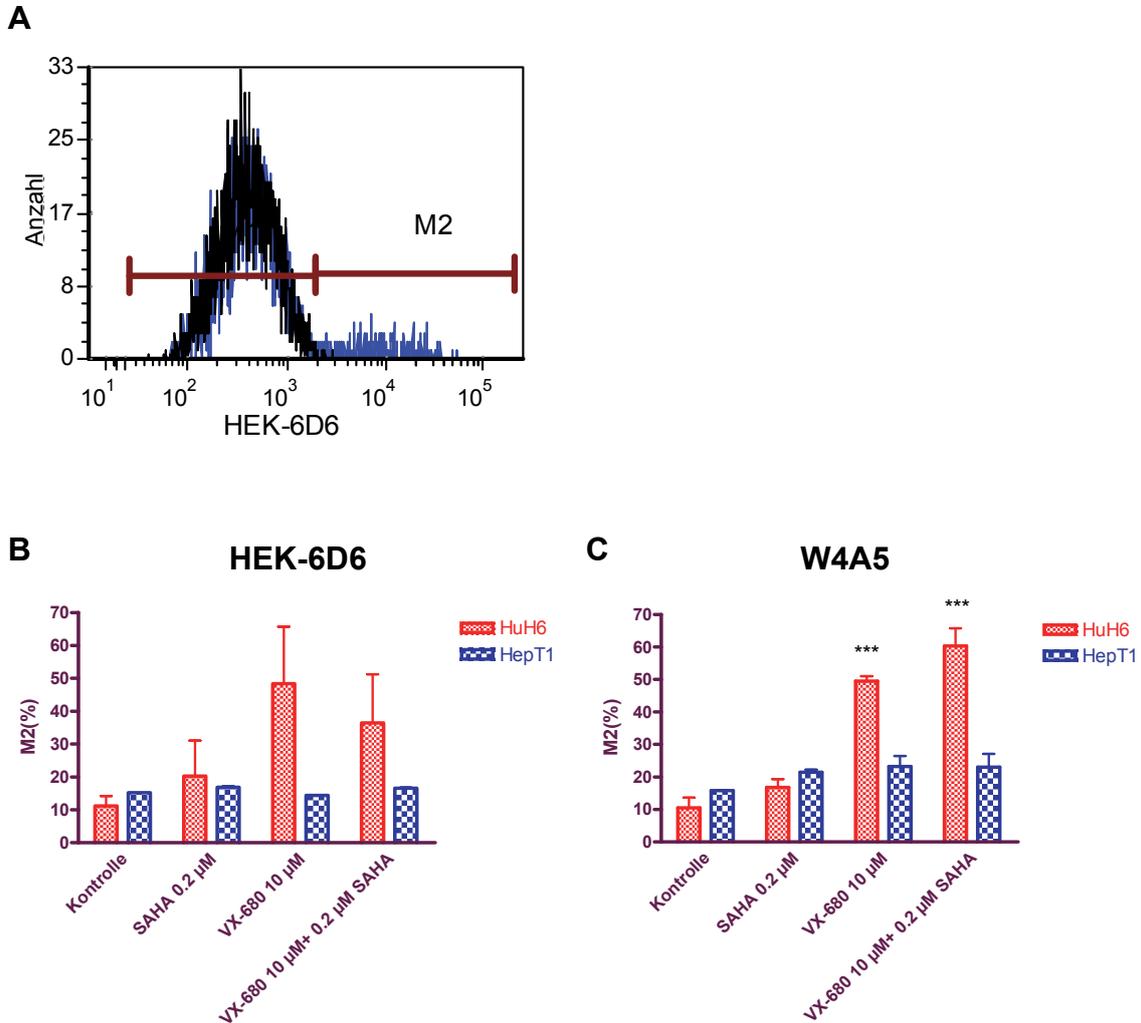


Abb. 19: Durchflusszytometrische Analyse mit HEK-6D6 und W4A5 bei HuH6- und HepT1-Zellen. (A) Im Histogramm ist beispielhaft die Bindung von HEK-6D6- und HuH6-Zellen dargestellt. Im Vergleich zur Negativkontrolle (schwarze Kurve) bindet HEK-6D6 an einer Subpopulation in der HuH6-Kultur (M2). Die Zugabe von SAHA und VX-680 bei HepT1-Zellen für 72 h + 72 h und bei HuH6-Zellen für 72 h + 24 h ändert den Anteil HEK-6D6- (B) und W4A5- (C) positiver Zellen in der Kultur. Dargestellt sind die Mittelwerte und Standardabweichung von drei Versuchen (***)Two-way ANOVA, Bonferroni test $p < 0.001$ im Vergleich zur Kontrolle).

Bei HuH6-Zellen kam es bei allen Inkubationsansätzen zu einer prozentualen Zunahme der Zellen, die positiv auf die Antikörper HEK-6D6 und W4A5 reagierten. Die Anzahl der HuH6-Zellen, die eine positive Reaktion auf den HEK-6D6 Antikörper zeigten, steigerte sich, wie im Balkendiagramm in Abb. 19 zu sehen, von ca. 10 % in der Kontrolle auf ca. 20 % in den Ansätzen, die mit 0,2 μM SAHA inkubiert wurden. In den Kulturen, die mit 10 μM VX-680 behandelt wurden, reagierten ca. 48 % der Zellen positiv auf HEK-6D6, bei den Zellen, die der Kombinationsbehandlung ausgesetzt waren, betrug der Anteil ca. 35 %. Aufgrund der großen Standardabweichung der Ergebnisse konnte jedoch keine Signifikanz ermittelt werden. Bei Betrachtung der Versuchsansätze, die mit dem W4A5-Antikörper gefärbt wurden, war ein Anstieg von ca. 10 % W4A5-positiven Zellen in der Kontrolle auf ca. 18 % durch die Inkubation mit 0,2 μM SAHA zu verzeichnen. Die Behandlung mit 10 μM VX-680 führte zu einem signifikanten Anstieg von W4A5-positiven Zellen auf ca. 50 %, in der Kombination mit 0,2 μM SAHA steigerte sich der Wert auf ca. 60 %. Bei der HepT1-Zelllinie war der Anteil der Kontrollzellen, die positiv auf die Antikörper HEK-6D6 und W4A5 reagierten, mit jeweils 15 % größer als bei HuH6-Zellen, jedoch konnte keine signifikante Veränderung in der Quantität der HEK-6D6- und W4A5-positiven Zellen unter verschiedenen Behandlungen festgestellt werden.

Aus diesen Versuchen ließ sich nicht deuten, ob die Zunahme von HuH6-Zellen mit stammzelltypischen Oberflächenmarkern unter Einfluss der Substanzen durch eine gesteigerte Expression oder durch eine Elimination der negativen Zellen hervorgerufen wurde.

3.7 Wirkung von VX-680 und SAHA auf Sphäroide

Um die Wirkung von VX-680 und SAHA auf „Multidrug“ resistente Zellen zu testen, wurden HB-Zellen auf sog. „low-binding“ Platten ausgesät. Durch die spezielle Beschichtung der 96-Well-Platten ordneten sich die Zellen in 3-dimensionalen Strukturen, in sogenannten Sphäroiden, an. Beide Zelllinien wurden mit einer Einzelbehandlung VX-680 (0 μM bis 100 μM) und in einer

Ergebnisse

Kombinationsbehandlung mit SAHA (0,5 μM) für 72 h inkubiert und anschließend mit EZ4U Proliferationsassays ausgewertet. Der Ansatz wurde parallel mit adhärent wachsenden Zellen durchgeführt und verglichen.

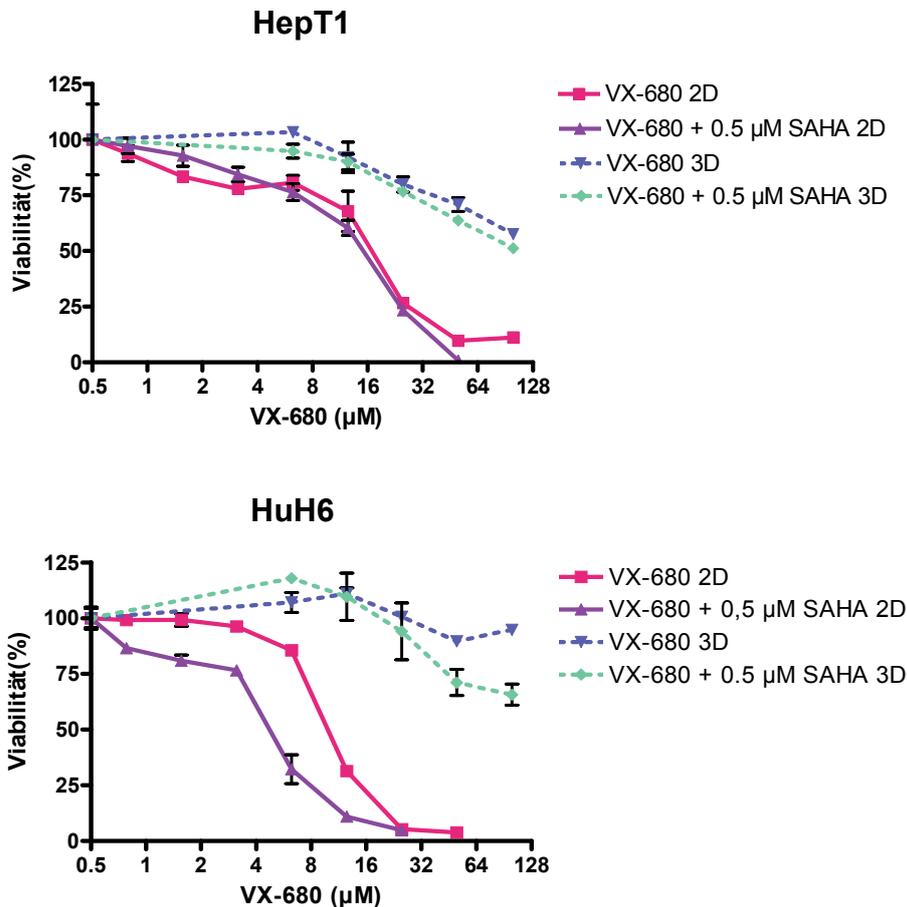


Abb. 20: Wirkung von VX-680 und SAHA auf die Viabilität von HB-Zellen in 2D- (durchgezogene Linien) und 3D- (gestrichelte Linien) Kulturen. VX-680 wurde in aufsteigenden Konzentrationen (0 bis 100 μM) in Kombination mit 0 oder 0,5 μM SAHA zu HepT1- und HuH6-Zellen gegeben. Die relative Zellviabilität wurde nach 72 h im EZ4U Proliferationsassay bezogen auf eine unbehandelte Kontrolle bestimmt. Die Daten repräsentieren Mittelwerte und Standardabweichung aus Triplikaten.

Es zeigte sich in der in Abb. 20 dargestellten Graphen, dass VX-680 und SAHA nur zu einer schwachen Proliferationshemmung bei Sphäroiden führen. Eine Hemmung der Viabilität konnte für HuH6- und HepT1-Zellen in der Kombination mit 0,5 μM SAHA ab einer Konzentration von ca. 8 μM VX-680 beobachtet

werden. Während der proliferationshemmende Effekt der Einzelbehandlung bei HuH6-Zellen etwas später bei ca. 13 μM VX-680 einsetzte, waren die Kurvenverläufe der Sphäroidassays für HepT1-Zellen in der Behandlung mit VX-680 und in der Kombination mit SAHA beinahe identisch. In den Proliferationsassays der 3D-Kulturen zeigte die alleinige Wirkung von 0,5 μM SAHA keinen proliferationshemmenden Effekt. In der Kombination mit VX-680 trat allerdings bei HuH6-Zellen in den Versuchen mit Sphäroidkulturen ab ca. 16 μM der gleiche synergistische Effekt auf, der bereits bei adhärennten HuH6-Zellen beobachtet wurde. Die Bestimmung einer halbmaximalen Proliferationshemmung war bei Sphäroidkulturen für beide Zelllinien nicht möglich. Bei der in den Versuchen verwendeten Maximalkonzentration von 100 μM VX-680 waren mehr als 50 % vitale Zellen in den Sphäroidkulturen beider Zelllinien zu finden. Eine künstlich hergestellte „Multidrug“-Resistenz konnte somit mit den eingesetzten Substanzen und Konzentrationen nicht umgangen werden.

4 Diskussion

4.1 Inhibition von Wee1- und MET-Kinasen in HB-Zellen

Ein alternativer Therapieansatz zu herkömmlichen Chemotherapeutika ist die sog. „Zielgerichtete molekulare Krebstherapie“. Darunter versteht man kleine Moleküle, die zielgerichtet in die Signaltransduktion von Tumorzellen eingreifen. Dazu zählen die Kinase-Inhibitoren Wee1-InhibitorII, SU11274 und der im nächsten Abschnitt besprochene Aurorakinase-Inhibitor VX-680. In den Proliferationsassays zeigte sich, dass der MET Kinase-Inhibitor SU11274 in physiologisch erreichbaren Konzentrationen praktisch zu keiner Viabilitätsreduktion bei HB-Zellen führte. Diese Beobachtung war insofern überraschend, als Daten, die im Rahmen einer Expressionsanalyse von Hepatoblastomen und normalen Hepatozyten gewonnen wurden (www.ebi.ac.uk/arrayexpress Zugangsnummer E-MEXP-1851), darlegen, dass es bei Hepatoblastomen zu einer Deregulation von MET kommt. Die Daten zeigten jedoch auch eine breite Varianz der MET-Expression auf, so dass von 25 Proben 12 eine stärkere und 13 eine schwächere MET-Expression als normales Lebergewebe aufwiesen. In einer weiteren Studie zeigte die Untersuchung von 13 HB-Proben, die vor einer Chemotherapie entnommen wurden, eine MET-Überexpression. Die beobachtete Reduzierung von MET nach einer chemotherapeutischen Behandlung wurde so gedeutet, dass MET eine wichtige Rolle in der Pathogenese dieses Tumors spielt [54]. Der in der Literatur beschriebene antiapoptotische Effekt von HGF (engl. *Hepatocyte growth factor*) bei mit Chemotherapeutika behandelten Hepatoblastomen lässt darauf schließen, dass es bei einer Hemmung von MET, dem Zielrezeptor von HGF und einer gleichzeitigen Behandlung mit Cisplatin zu einer gesteigerten Apoptoseinduktion kommen sollte [53]. Da SU11274 keinerlei Wirkung in der Einzelbehandlung zeigte, wurde diese Kombination nicht evaluiert. Die in der Genexpressionsanalyse ermittelte breite Varianz der MET-Expression bei Hepatoblastomen könnte ein Hinweis darauf sein, dass die Deregulation von MET keine Schlüsselrolle in der Pathogenese des Hepatoblastoms spielt,

obwohl eine Proliferationsinduktion durch HGF in den HB-Zelllinien HepT1 und HuH6 nachgewiesen werden konnte [94].

Im Gegensatz zu SU11274 führt der Wee1-InhibitorII konzentrationsabhängig zu einer Proliferationshemmung von HepT1- und HuH6-Zellen. Dass mit ca. 29 μM für eine halbmaximale Proliferationshemmung bei beiden Zelllinien eine recht hohe Konzentration angesetzt werden musste, war zunächst nicht sehr verwunderlich, da in den meisten Studien Wee1-Inhibitoren eine starke zytotoxische Wirkung erst in Kombination mit DNA-schädigenden Substanzen, z. B. Chemotherapeutika, entfalten konnten [95, 96]. Der Wee1-InhibitorII zeigte jedoch in der Kombination mit CDDP keine verstärkte proliferationshemmende Wirkung. In einer Studie wird geschildert, dass vor allem bei Tumoren mit einer p53 Defizienz durch Hemmung der Wee1-Kinase eine verstärkte Sensibilisierung gegenüber Chemotherapeutika auftritt [96]. In der Literatur sind für sporadisch auftretende Hepatoblastome zehn verschiedene Mutationen an p53 beschrieben worden, die allerdings nur bei 24 % aller untersuchten Tumoren auftraten [97]. In einer weiteren Studie konnten hingegen in 15 HB-Proben und in fünf unterschiedlichen Zelllinien, darunter HepT1 und HuH6, keine Überexpression und keine Mutationen von p53 nachgewiesen werden [98]. Die Datenlage deutet darauf hin, dass p53 für die Genese des Hepatoblastoms keine Schlüsselrolle einnimmt. Die mangelnde Wirkungsverstärkung mit CDDP ist somit mit der multifaktoriellen Genese des HBs in Einklang zu bringen, in der p53 Mutationen wahrscheinlich nur eine untergeordnete Rolle spielen.

4.2 Inhibition von Aurorakinasen in HB-Zellen

Die Behandlung der HB-Zelllinien HepT1 und HuH6 mit VX-680 führte dosisabhängig zu einer stärkeren Reduktion der Viabilität als der Wee1-InhibitorII. Die proliferationshemmende Wirkung war dabei bei HuH6-Zellen deutlich stärker als bei HepT1 ausgeprägt, so dass beim Vergleich der IC_{50} -Werte die halbmaximale Proliferationshemmung bei der Hälfte der VX-680-Konzentration erreicht werden konnte. Es zeigte sich somit, dass die Zelllinie,

die sensibler gegenüber CDDP ist, auch empfindlicher auf VX-680 reagiert. Da in der Literatur Histon H3 als Hauptsubstrat für Aurorakinasen beschrieben ist, konzentrierte sich die Arbeit auf die Veränderung der Phosphorylierung von Serin 10 an Histon H3-Proteinen [59, 65]. Es zeigte sich, dass die Phosphorylierung unter Einfluss von VX-680 stark reduziert wurde. Durch die essentielle Rolle, die phosphoryliertem Histon H3 in der Zellteilung und im Zellzyklus zukommt, ist die Viabilitätsreduzierung mit einer Abnahme der Histonphosphorylierung in Einklang zu bringen. Die unterschiedliche Sensibilität der Zelllinien VX-680 gegenüber lässt sich durch den unterschiedlichen Phosphorylierungsgrad von Histon H3 in HepT1 und HuH6-Zellen erklären. Es war zu beobachten, dass die basale Phosphorylierung an Histon H3 (Serin 10) bei Hepatoblastomzellen sehr schwach ist, was darauf hindeuten könnte, dass sich der überwiegende Anteil der Zellen nicht in der G2-Phase befindet. Jedoch zeigten sich trotzdem Unterschiede zwischen den Zelllinien, so dass bei der häufiger phosphorylierten HuH6-Zelllinie auch eine stärkere Proliferationshemmung unter Einfluss von VX-680 beobachtet werden konnte. Die in Abschnitt 3.4.1 beobachtete ausgeprägtere Phosphorylierung von HepT1 kann eventuell darauf zurückgeführt werden, dass nur ein kleiner Ausschnitt des Versuchs wiedergegeben wurde. In der FACS-Analyse und in der Western Blot-Darstellung, die eine deutlich größere Zellzahl repräsentieren, zeigte sich hingegen eindeutig, dass HuH6-Zellen eine häufigere Phosphorylierung an Histon H3 als HepT1-Zellen aufweisen. Da in immunhistochemisch untersuchten Gewebeschnitten, sowohl in Xenotransplantaten als auch in den humanen HB-Präparaten, eine Phosphorylierung von Histon H3 an Serin 10 nachgewiesen werden konnte, ist davon auszugehen, dass VX-680 nicht nur bei Zelllinien, sondern auch in vivo eine proliferationshemmende Wirkung auf HB-Zellen hat.

Es zeigte sich, dass der Aurorakinase-Inhibitor zu morphologischen Veränderungen der Zellen führte. In beiden Zelllinien konnte neben einer Abnahme der Zellpopulation eine Vakuolenbildung und ein Anschwellen der Zellen bemerkt werden. Es war zu beobachten, dass HuH6- und HepT1-Zellen ein Mehrfaches ihrer ursprünglichen Größe erreichten, wobei die Wirkung wie

auch in den Proliferationsassays bei HuH6-Zellen stärker ausgeprägt war. Für diverse Tumorentitäten wurde unter Einfluss von VX-680 eine Arretierung des Zellzyklus in der G2/M-Phase beobachtet, die zu einer Polyploidie der Zellen führt [99]. Wahrscheinlich hat der Aurorakinase-Inhibitor auf HB-Zellen die gleiche Wirkung und das Anschwellen der Zellen ist auf die Vervielfachung des Chromosomensatzes ohne anschließende Zellteilung zurückzuführen (von manchen Autoren auch als mitotische Katastrophe bezeichnet [100]). Da eine wichtige Konsequenz von andauernder Zellarretierung der induzierte Zelltod ist, wurden beide Zelllinien auf die Induktion von Apoptose unter Einfluss von VX-680 überprüft. Es zeigte sich, dass diese abhängig von der VX-680 Dosierung induziert wird. Wie zu erwarten war, reagierten HuH6-Zellen sensibler auf VX-680 und es kam zu einer stärkeren Apoptoseinduktion als bei HepT1-Zellen. Diese Beobachtungen gehen konform mit den Effekten von VX-680, die in anderen Zelllinien aufgezeigt wurden, und den bekannten Funktionen der Aurorakinasen den Zellzyklus und die Apoptose betreffend [73, 101]. Die gewonnenen Daten deuten darauf hin, dass VX-680 bei HB-Zellen über die Hemmung von Aurorakinasen zur Proliferationshemmung, Zellzyklusarretierung und daraus folgend zum Zelltod führt.

Da für das Hepatoblastom bereits etablierte Chemotherapieprotokolle bestehen, wurde in Proliferationsassays die Kombination VX-680 mit CDDP untersucht. Bei der Datenanalyse zeigte sich, dass die Kombinationswirkung etwas schwächer als die Summe der Einzelwirkungen ist. Somit wirkten zwar beide Substanzen stärker als jeweils in der Einzelbehandlung, jedoch war kein additiver Effekt zu verzeichnen. Bei Ovarialtumoren wurde eine synergistische Wirkung des Aurorakinase-Inhibitors VE-465 mit dem Chemotherapeutikum Paclitaxel festgestellt, jedoch trat dieser Effekt nur bei geringen Dosen des Chemotherapeutikums auf [102]. Da in dieser Arbeit nur die Standardkonzentration von 2,5 µg/ml (IC_{50} der HuH6-Zelllinie) verwendet wurde, kann keine Aussage darüber getroffen werden, ob bei geringeren Konzentrationen von CDDP ein eventueller synergistischer Effekt mit VX-680 auftritt. Da CDDP auch zu einer mitotischen Katastrophe führt, kann es durchaus sein, dass bei geringeren Konzentrationen ein synergistischer Effekt

auftritt, der bei höheren Konzentrationen durch eine Konkurrenz der beiden Substanzen verschwindet.

Die Annahme zugrunde legend, dass in Tumorphysen unterschiedliche Differenzierungsstufen der Tumorzellen vorhanden sind, die eine differenzielle Sensibilisierung gegenüber Inhibitoren aufzeigen, wurde des Weiteren untersucht, ob sich eine Veränderung von mutmaßlichen Stammzellmarkern bei Hepatoblastomen unter Langzeitbehandlung nachweisen lässt. Es war zu beobachten, dass es bei HuH6-Zellen nach einer mehrere Tage dauernden Inkubation zu einer Selektion der Zellen kommt, die positiv auf die Antikörper HEK-6D6 und W4A5 reagieren, die sich gegen stammzelltypische Oberflächenmarker richten. Davon ausgehend, dass es sich bei den übrig gebliebenen Zellen um Zellen mit Stammzellcharakter handelt, ist die mangelnde Sensibilität VX-680 gegenüber durchaus mit der bekannten Chemoresistenz von Stammzellen zu vereinbaren. Zwar zeigte sich bereits in den vorangegangenen Versuchen, dass HuH6-Zellen sensibler auf VX-680 reagieren, dennoch ist es überraschend, dass es bei HepT1-Zellen zu keiner Zunahme der auf den Oberflächenmarker positiv reagierenden Zellen kommt. Warum es bei HuH6 im Gegensatz zu HepT1-Zellen zu einer Selektion von Zellen mit Stammzellcharakter gekommen ist, lässt sich nur schwer mit dem schwächeren Ansprechen der HepT1-Zelllinie auf VX-680 erklären, da nach der Langzeitinkubation, die 48 h länger als bei HuH6-Zellen durchgeführt wurde auch nur noch sehr wenige Zellen am Leben waren. Eine Erklärung für die homogene Elimination von HepT1-Zellen kann der höhere prozentuale Anteil von Zellen mit Stammzellcharakter in den Kontrollproben und die langsamere Proliferation der Zelllinie sein. Durch die langsamere Proliferation der HepT1-Zellen wird der Unterschied zwischen den einzelnen Differenzierungsstufen geringer ausfallen, was durchaus eine homogenere Elimination der Population erklärt. Da HuH6-Zellen eine höhere Proliferationsrate als HepT1 aufweisen, kommt es wahrscheinlich durch die Langzeitbehandlung selektiv zur Reduzierung der sich schnell teilenden Population, während die Zellen mit Stammzellcharakter vermehrt überleben. Ob die negativ Population eliminiert oder ob die Oberflächenmarker durch die Behandlung induziert worden sind,

bleibt jedoch spekulativ. Weiterführende Untersuchungen zur Identifikation und Isolation von Stammzellen wie z. B. der Aldefluor Test könnten über die Differenzierung der Zellen Klarheit schaffen, da diese Methode auf der Untersuchung der stammzelltypischen Dehydrogenase und nicht auf der Untersuchung von Oberflächenmarkern basiert.

4.3 Auswirkung von Phosphorylierung und Acetylierung von Histonproteinen in HB-Zellen

Da sowohl VX-680 als auch SAHA in ihrem Wirkprofil an Histon H3-Proteinen ansetzen, wurde diese Kombinationsbehandlung ebenfalls im Rahmen dieser Arbeit evaluiert. Bei Zellen der akuten und chronischen myeloischen Leukämie wurde diese Kombinationsbehandlung bereits bewertet, und eine synergistische proliferationshemmende Wirkung von VX-680 und SAHA beschrieben [86]. Interessanterweise zeigte SAHA, obwohl es in der Einzelbehandlung nur eine sehr schwache proliferationshemmende Wirkung zu haben schien, in der Kombination mit VX-680 bei der HuH6-Zelllinie einen synergistischen proliferationshemmenden Effekt. Auch bei Betrachtung der Größenzunahme von HB-Zellen zeigte sich nur bei HuH6-Zellen in der Einzelbehandlung mit SAHA und in der Kombination mit VX-680 eine Zunahme des Zelldurchmessers. Bei der Untersuchung, inwieweit sich SAHA alleine und in der Kombination mit VX-680 auf die Induktion der Apoptose in HB-Zellen auswirkt, war bei beiden Zelllinien in der Einzelbehandlung eine Zunahme von apoptotischen Zellen zu beobachten. In der Kombination mit SAHA konnte jedoch keine Wirkungsverstärkung des proapoptotischen Effekts von VX-680 verzeichnet werden. Da in einer anderen Studie, in der die 5-fache Konzentration von SAHA in Kombination mit dem Proteasom-Inhibitor Bortezomib eingesetzt wurde, eine synergistische Apoptoseinduktion bei HuH6-Zellen festzustellen war, ist nicht auszuschließen, dass dieser Effekt bei höheren Konzentration auch mit VX-680 zu beobachten ist [103]. Da allerdings Konzentrationen ab 5 μM zu toxischen Schäden an Hepatozyten führen, wurde SAHA nur im niedrigen Konzentrationsbereich evaluiert [104]. Bei der

genaueren Untersuchung der synergistischen Wirkung der Proliferationshemmung bei HuH6-Zellen konnte keine gesteigerte Dephosphorylierung von Histon H3 an Serin 10 in der Kombinationsbehandlung festgestellt werden. Auch mit Hinblick auf den am besten beschriebenen Wirkmechanismus von SAHA, die Deacetylierung von Histon-Proteinen, konnte die synergistische Wirkung nicht erklärt werden. Interessanterweise zeigte SAHA gerade bei der HepT1-Zelllinie, bei der nur eine schwache Wirkung von SAHA und kein synergistischer Effekt verzeichnet werden konnte, in einer Konzentrationsreihe von 0,2-2 μM eine deutliche Zunahme der Acetylierung an Histon H3. Bei HuH6-Zellen hingegen führte SAHA nicht zu einer messbaren Zunahme der Acetylierung, was wahrscheinlich der starken Acetylierung in den Kontrollproben geschuldet war. Da bereits 0,4 μM SAHA zu einer starken Zunahme der Acetylierung führte, aber bei der gleichen Konzentration in den Proliferationsassays bei HepT1-Zellen keine deutliche Viabilitätsreduzierung festgestellt werden konnte, liegt die Vermutung nahe, dass eine gesteigerte Gesamtacetylierung von Histon-Proteinen nicht in einem engen Zusammenhang mit der Viabilitätsabnahme von HB-Zellen steht. Interessanterweise ist auch gerade in den Kontrollproben bei HuH6-Zellen, die nicht nur schneller proliferieren, sondern auch empfindlicher auf SAHA reagieren, eine stärkere Acetylierung als bei HepT1-Zellen festzustellen. D. h., eine weiter gesteigerte Acetylierung wäre nicht mit einer erhöhten Proliferationshemmung bei dieser Zelllinie zu vereinbaren. Wie SAHA auf Hepatoblastomzellen wirkt und wie die synergistische Wirkung mit VX-680 bei HuH6-Zellen zustande kommt, bleibt somit offen. In der Studie, in der VX-680 und SAHA an ALL-Zellen evaluiert wurden, zeigte sich, dass SAHA unter anderem zu einer Herunterregulation der Aurorakinasen A und B führte, womit der synergistische Effekt mit VX-680 erklärt wurde [88]. Der Gehalt der Aurorakinasen wurde in dieser Arbeit zwar nicht direkt gemessen, jedoch zeigte die Bestimmung der Phosphorylierung an Histon H3 indirekt, dass es zu keiner Herunterregulation der Aurorakinasenaktivität unter Einfluss von SAHA bei HuH6-Zellen kommt. Da sowohl VX-680 als auch SAHA ein mannigfaltiges Wirkungsprofil aufweisen, das noch nicht im Ganzen bekannt ist, kann der

Grund für den synergistischen Effekt auch die Beeinflussung weiterer am Zellzyklus beteiligter Proteine wie z. B. Acetyl-Tubuline sein.

Inwieweit die Kombination mit SAHA auch in vivo zu einer Wirkungsverstärkung beiträgt, lässt sich aufgrund des komplexen Wirkungsprofils und des nicht geklärten synergistischen Effekts bei HuH6-Zellen schwer voraussagen. In der Genexpressionsanalyse des Hepatoblastoms ließ sich nur für HDAC 2 eine Überexpression aufzeigen [29]. Zusammen mit der in dieser Arbeit immunhistochemisch dargestellten starken Acetylierung von HB-Geweben deutet dies darauf hin, dass eine Überexpression von Histon-Deacetylasen, mit der Folge, dass Histone in hypoacetyliertem Zustand vorliegen, wie sie bei zahlreichen anderen Tumorentitäten beobachtet wurde, nicht der Pathogenese des HBs zugrunde liegt.

4.4 Wirkung von VX-680 auf „Multidrug“-resistente HB-Zellen

Um zu untersuchen, wie „Multidrug“-resistente Zellen auf VX-680 reagieren, wurde aufgrund der Schwierigkeit der direkten Gewinnung von resistenten Zellen aus Hepatoblastomen das Modell der 3D-Kulturen eingeführt [105]. Durch die große Anzahl an Zellen und die spezielle Beschichtung der Inkubationsplatten ordneten sich die Kulturen in räumlichen Strukturen (sog. Sphäroiden) an, wodurch eine künstliche Chemoresistenz erzeugt wurde. Bei Betrachtung der Wirkung von VX-680 auf die Proliferationshemmung in Sphäroiden zeigte der Aurorakinase-Inhibitor jedoch nur einen geringen Effekt. Somit konnten in einem erschaffenen System mit vielen Zellkontakten und künstlich erzeugten „Multidrug“-Resistenzen keine Vorteile gegenüber der Behandlung mit CDDP herausgestellt werden. Allgemein sind die Ergebnisse aus solchen Modellen schwierig auf die Wirkung von Substanzen in Organismen zu übertragen, da der proliferationshemmende Effekt sich auf die alleinige Wirkung an Tumorzellen reduziert. So zeigte sich z. B., dass VX-680 im Xenograft-Modell des klarzelligen Nierenzellkarzinoms einen hemmenden Effekt auf die Gefäßproliferation hat [99]. Solche Nebeneffekte können somit nur im Tier-Modell evaluiert werden.

5 Ausblick

Die erhobenen Daten zeigen einen antiproliferativen und proapoptotischen Effekt von VX-680 an Hepatoblastomzellen in vitro. Zusätzlich zeigt sich eine synergistische Wirkung von VX-680 und SAHA bei der HuH6-Zelllinie. Die in Hepatoblastomgewebe nachgewiesene Phosphorylierung an Histon H3 stellt die Grundlage dafür, dass die Erprobung von VX-680 im Xenograft-Modell Sinn macht. Ob die Kombination mit SAHA auch in vivo zu einer Steigerung der antiproliferativen Wirkung führt, bleibt offen, zumal die molekulare Grundlage des synergistischen Effektes nicht geklärt werden konnte. Da in vitro Effekte wie z. B. der hemmende Einfluss von VX-680 auf die Gefäßproliferation nicht untersucht werden können, ist es wahrscheinlich, dass VX-680 in vivo eine stärkere Wirkung auf das Hepatoblastom hat als an Zellkulturen.

6 Zusammenfassung

Das Hepatoblastom ist der am häufigsten vorkommende bösartige Lebertumor im Kleinkindalter und in der Kindheit. Er stellt ca. 1 % der bösartigen Kindertumore dar und hat im fortgeschrittenen Stadium eine schlechte Prognose. Ein sehr großes Problem ist die Entwicklung von Resistenzen gegenüber klassischen Zytostatika. Aufgrund ihrer potentiellen zytostatischen und zytotoxischen Wirkung stellen Modulatoren der Kinasesignalübermittlung einen vielversprechenden Ansatz in der Tumorthherapie dar.

Ziel der vorliegenden Untersuchung war die Analyse der antineoplastischen Wirkung der Kinase-Inhibitoren VX-680, Wee1-InhibitorII und SU11274 auf HB-Zellen der Linien HepT1 und HuH6. VX-680 und Wee1-InhibitorII wurden sowohl einzeln als auch in Kombination mit dem Chemotherapeutikum CDDP mit den Zelllinien inkubiert. VX-680 wurde zusätzlich in der Kombination mit dem Histon-Deacetylase-Inhibitor SAHA evaluiert. In Proliferationsassays konnte der stärkste proliferationshemmende Effekt auf HB-Zellen für VX-680 dokumentiert werden. Es zeigte sich, dass HuH6-Zellen deutlich sensibler auf den Aurorakinase-Inhibitor reagierten als HepT1-Zellen. Der IC_{50} -Wert wurde für HuH6 mit 8 μ M und bei HepT1 mit 16,6 μ M bestimmt. Während VX-680 zu keiner additiven Proliferationshemmung von CDDP beitrug, zeigte sich bei gesteigerter Dephosphorylierung und vermehrter Acetylierung mit VX-680 und SAHA eine synergistische Wirkung auf den proliferationshemmenden Effekt bei HuH6-Zellen. Die Inhibition mit VX-680 führt zu einem Anstieg apoptotischer Zellen und zu morphologischen Veränderungen wie Vakuolenbildung und einem Anschwellen der Zellen und Zellkerne. Mit Hilfe von Western Blot, Immunfluoreszenz und FACS Analyse ließ sich eine Abnahme der Phosphorylierung an Serinresten von Histon H3-Proteinen unter Einwirkung von VX-680 in HB-Zellen dokumentieren. Die Inkubation von HuH6-Zellen mit VX-680 führte zu einer Anreicherung von Tumorzellen mit Stammzellcharakter. In einem Modell zur Chemoresistenz (3D) konnten, im Vergleich zu 2D-Kulturen, keine wesentliche Proliferationsabnahme durch VX-680 und SAHA beobachtet werden. Unter den getesteten Kinase-Inhibitoren zeigte VX-680 eine spezifische Wirkung auf die Dephosphorylierung von Histon H3-Proteinen und zelluläre Effekte wie Proliferationshemmung, Zellschwellung und Apoptose-induktion bei HB-Zellen. Die Wirkung von VX-680 bei resistenten Zellen und auf vermeintliche Tumorstammzellen deutet jedoch auf einen limitierten Nutzen des Kinase-Inhibitors für die Gruppe der therapierefraktären Hepatoblastome hin.

7 Literaturverzeichnis

1. Gesellschaft, I.L.d.D.K.u.d., et al.
2. <http://emedicine.medscape.com/article/986802>.
3. Brown, J., et al., *Pretreatment prognostic factors for children with hepatoblastoma--results from the International Society of Paediatric Oncology (SIOP) study SIOPEL 1*. Eur J Cancer, 2000. **36**(11): p. 1418-25.
4. Elliott, M., et al., *Clinical features and natural history of Beckwith-Wiedemann syndrome: presentation of 74 new cases*. Clin Genet, 1994. **46**(2): p. 168-74.
5. Giardiello, F.M., et al., *Hepatoblastoma and APC gene mutation in familial adenomatous polyposis*. Gut, 1996. **39**(6): p. 867-9.
6. Hirschman, B.A., et al., *The spectrum of APC mutations in children with hepatoblastoma from familial adenomatous polyposis kindreds*. J Pediatr, 2005. **147**(2): p. 263-6.
7. Exelby, P.R., et al., *Liver tumors in children in the particular reference to hepatoblastoma and hepatocellular carcinoma: American Academy of Pediatrics Surgical Section Survey--1974*. J Pediatr Surg, 1975. **10**(3): p. 329-37.
8. Saxena, R., et al., *Chemotherapy effects on hepatoblastoma. A histological study*. Am J Surg Pathol, 1993. **17**(12): p. 1266-71.
9. Fuchs, J., et al., *The influence of preoperative chemotherapy and surgical technique in the treatment of hepatoblastoma--a report from the German Cooperative Liver Tumour Studies HB 89 and HB 94*. Eur J Pediatr Surg, 2002. **12**(4): p. 255-61.
10. Fuchs, J., et al., *Pretreatment prognostic factors and treatment results in children with hepatoblastoma: a report from the German Cooperative Pediatric Liver Tumor Study HB 94*. Cancer, 2002. **95**(1): p. 172-82.
11. Ruck, P., et al., *Hepatic stem-like cells in hepatoblastoma: expression of cytokeratin 7, albumin and oval cell associated antigens detected by OV-1 and OV-6*. Histopathology, 1997. **31**(4): p. 324-9.
12. Ruck, P., et al., *Small epithelial cells and the histogenesis of hepatoblastoma. Electron microscopic, immunoelectron microscopic, and immunohistochemical findings*. Am J Pathol, 1996. **148**(1): p. 321-9.
13. Fiegel, H.C., et al., *Stem-like cells in human hepatoblastoma*. J Histochem Cytochem, 2004. **52**(11): p. 1495-501.
14. Stocker, J.T., *Hepatoblastoma*. Semin Diagn Pathol, 1994. **11**(2): p. 136-43.
15. Dutly, F., et al., *Seven cases of Wiedmann-Beckwith syndrome, including the first reported case of mosaic paternal isodisomy along the whole chromosome 11*. Am J Med Genet, 1998. **79**(5): p. 347-53.
16. Oda, H., et al., *Somatic mutations of the APC gene in sporadic hepatoblastomas*. Cancer Res, 1996. **56**(14): p. 3320-3.
17. Koch, A., et al., *Childhood hepatoblastomas frequently carry a mutated degradation targeting box of the beta-catenin gene*. Cancer Res, 1999. **59**(2): p. 269-73.
18. Jeng, Y.M., et al., *Somatic mutations of beta-catenin play a crucial role in the tumorigenesis of sporadic hepatoblastoma*. Cancer Lett, 2000. **152**(1): p. 45-51.
19. Parada, L.A., et al., *Cytogenetics of hepatoblastoma: further characterization of 1q rearrangements by fluorescence in situ hybridization: an international collaborative study*. Med Pediatr Oncol, 2000. **34**(3): p. 165-70.
20. Sainati, L., et al., *Cytogenetic analysis of hepatoblastoma: hypothesis of cytogenetic evolution in such tumors and results of a multicentric study*. Cancer Genet Cytogenet, 1998. **104**(1): p. 39-44.
21. Arsic, D., et al., *Switched-on Sonic hedgehog: a gene whose activity extends beyond fetal development--to oncogenesis*. J Paediatr Child Health, 2007. **43**(6): p. 421-3.
22. Taniguchi, K., et al., *Mutational spectrum of beta-catenin, AXIN1, and AXIN2 in hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas*. Oncogene, 2002. **21**(31): p. 4863-71.
23. von Schweinitz, D., et al., *Complete resection before development of drug resistance is essential for survival from advanced hepatoblastoma--a report from the German Cooperative Pediatric Liver Tumor Study HB-89*. J Pediatr Surg, 1995. **30**(6): p. 845-52.

24. von Schweinitz, D., et al., *Prognostic factors and staging systems in childhood hepatoblastoma*. Int J Cancer, 1997. **74**(6): p. 593-9.
25. Aronson, D.C., et al., *Predictive value of the pretreatment extent of disease system in hepatoblastoma: results from the International Society of Pediatric Oncology Liver Tumor Study Group SIOPEL-1 study*. J Clin Oncol, 2005. **23**(6): p. 1245-52.
26. Perilongo, G., et al., *Cisplatin versus cisplatin plus doxorubicin for standard-risk hepatoblastoma*. N Engl J Med, 2009. **361**(17): p. 1662-70.
27. Zsiros, J., et al., *Successful treatment of childhood high-risk hepatoblastoma with dose-intensive multiagent chemotherapy and surgery: final results of the SIOPEL-3HR study*. J Clin Oncol, 2010. **28**(15): p. 2584-90.
28. Perilongo, G., et al., *Risk-adapted treatment for childhood hepatoblastoma. final report of the second study of the International Society of Paediatric Oncology--SIOPEL 2*. Eur J Cancer, 2004. **40**(3): p. 411-21.
29. Cairo, S., et al., *Hepatic stem-like phenotype and interplay of Wnt/beta-catenin and Myc signaling in aggressive childhood liver cancer*. Cancer Cell, 2008. **14**(6): p. 471-84.
30. Warmann, S., et al., *The role of the MDR1 gene in the development of multidrug resistance in human hepatoblastoma: clinical course and in vivo model*. Cancer, 2002. **95**(8): p. 1795-801.
31. Vander Borght, S., et al., *Up-regulation of breast cancer resistance protein expression in hepatoblastoma following chemotherapy: A study in patients and in vitro*. Hepatol Res, 2008. **38**(11): p. 1112-21.
32. von Schweinitz, D., et al., *Efficiency and toxicity of ifosfamide, cisplatin and doxorubicin in the treatment of childhood hepatoblastoma. Study Committee of the Cooperative Paediatric Liver Tumour Study HB89 of the German Society for Paediatric Oncology and Haematology*. Eur J Cancer, 1997. **33**(8): p. 1243-9.
33. Arena, S., et al., *Understanding how kinase-targeted therapies work*. Cell Cycle, 2008. **7**(11): p. 1560-3.
34. Blume-Jensen, P., et al., *Oncogenic kinase signalling*. Nature, 2001. **411**(6835): p. 355-65.
35. Hunter, T., *Signaling--2000 and beyond*. Cell, 2000. **100**(1): p. 113-27.
36. Kolibaba, K.S., et al., *Protein tyrosine kinases and cancer*. Biochim Biophys Acta, 1997. **1333**(3): p. F217-48.
37. Sherr, C.J., *Cancer cell cycles*. Science, 1996. **274**(5293): p. 1672-7.
38. Watanabe, N., et al., *Regulation of the human WEE1Hu CDK tyrosine 15-kinase during the cell cycle*. EMBO J, 1995. **14**(9): p. 1878-91.
39. Liu, F., et al., *Overproduction of human Myt1 kinase induces a G2 cell cycle delay by interfering with the intracellular trafficking of Cdc2-cyclin B1 complexes*. Mol Cell Biol, 1999. **19**(7): p. 5113-23.
40. Rajeshkumar, N.V., et al., *MK-1775, a Potent Wee1 Inhibitor, Synergizes with Gemcitabine to Achieve Tumor Regressions, Selectively in p53-Deficient Pancreatic Cancer Xenografts*. Clin Cancer Res, 2011. **17**(9): p. 2799-2806.
41. De Witt Hamer, P.C., et al., *WEE1 kinase targeting combined with DNA damaging cancer therapy catalyzes mitotic catastrophe*. Clin Cancer Res, 2011.
42. Hirai, H., et al., *MK-1775, a small molecule Wee1 inhibitor, enhances anti-tumor efficacy of various DNA-damaging agents, including 5-fluorouracil*. Cancer Biol Ther, 2010. **9**(7): p. 514-22.
43. Pelicci, G., et al., *The motogenic and mitogenic responses to HGF are amplified by the Shc adaptor protein*. Oncogene, 1995. **10**(8): p. 1631-8.
44. Ma, P.C., et al., *c-Met: structure, functions and potential for therapeutic inhibition*. Cancer Metastasis Rev, 2003. **22**(4): p. 309-25.
45. Peruzzi, B., et al., *Targeting the c-Met signaling pathway in cancer*. Clin Cancer Res, 2006. **12**(12): p. 3657-60.
46. Engelman, J.A., et al., *MET amplification leads to gefitinib resistance in lung cancer by activating ERBB3 signaling*. Science, 2007. **316**(5827): p. 1039-43.
47. Lee, J., et al., *Impact of MET amplification on gastric cancer: Possible roles as a novel prognostic marker and a potential therapeutic target*. Oncol Rep, 2011.

48. Yamamoto, S., et al., *Gene amplification and protein overexpression of MET are common events in ovarian clear-cell adenocarcinoma: their roles in tumor progression and prognostication of the patient*. Mod Pathol, 2011.
49. Janjigian, Y.Y., et al., *MET expression and amplification in patients with localized gastric cancer*. Cancer Epidemiol Biomarkers Prev, 2011.
50. Davis, I.J., et al., *Identification of the receptor tyrosine kinase c-Met and its ligand, hepatocyte growth factor, as therapeutic targets in clear cell sarcoma*. Cancer Res, 2010. **70**(2): p. 639-45.
51. Kenessey, I., et al., *Inhibition of c-Met with the specific small molecule tyrosine kinase inhibitor SU11274 decreases growth and metastasis formation of experimental human melanoma*. Curr Cancer Drug Targets, 2010. **10**(3): p. 332-42.
52. Koon, E.C., et al., *Effect of a c-Met-specific, ATP-competitive small-molecule inhibitor SU11274 on human ovarian carcinoma cell growth, motility, and invasion*. Int J Gynecol Cancer, 2008. **18**(5): p. 976-84.
53. Grotegut, S., et al., *Hepatocyte growth factor protects hepatoblastoma cells from chemotherapy-induced apoptosis by AKT activation*. Int J Oncol, 2010. **36**(5): p. 1261-7.
54. Ranganathan, S., et al., *beta-Catenin and met deregulation in childhood Hepatoblastomas*. Pediatr Dev Pathol, 2005. **8**(4): p. 435-47.
55. Adams, R.R., et al., *Chromosomal passengers and the (aurora) ABCs of mitosis*. Trends Cell Biol, 2001. **11**(2): p. 49-54.
56. Bischoff, J.R., et al., *The Aurora/lpl1p kinase family: regulators of chromosome segregation and cytokinesis*. Trends Cell Biol, 1999. **9**(11): p. 454-9.
57. Carmena, M., et al., *The cellular geography of aurora kinases*. Nat Rev Mol Cell Biol, 2003. **4**(11): p. 842-54.
58. Giet, R., et al., *Aurora/lpl1p-related kinases, a new oncogenic family of mitotic serine-threonine kinases*. J Cell Sci, 1999. **112** (Pt 21): p. 3591-601.
59. Hsu, J.Y., et al., *Mitotic phosphorylation of histone H3 is governed by lpl1/aurora kinase and Glc7/PP1 phosphatase in budding yeast and nematodes*. Cell, 2000. **102**(3): p. 279-91.
60. Terada, Y., et al., *AIM-1: a mammalian midbody-associated protein required for cytokinesis*. EMBO J, 1998. **17**(3): p. 667-76.
61. Kawasaki, A., et al., *Downregulation of an AIM-1 kinase couples with megakaryocytic polyploidization of human hematopoietic cells*. J Cell Biol, 2001. **152**(2): p. 275-87.
62. Murata-Hori, M., et al., *The kinase activity of aurora B is required for kinetochore-microtubule interactions during mitosis*. Curr Biol, 2002. **12**(11): p. 894-9.
63. Kimura, M., et al., *Cell cycle-dependent expression and centrosome localization of a third human aurora/lpl1-related protein kinase, AIK3*. J Biol Chem, 1999. **274**(11): p. 7334-40.
64. Bischoff, J.R., et al., *A homologue of Drosophila aurora kinase is oncogenic and amplified in human colorectal cancers*. EMBO J, 1998. **17**(11): p. 3052-65.
65. Crosio, C., et al., *Mitotic phosphorylation of histone H3: spatio-temporal regulation by mammalian Aurora kinases*. Mol Cell Biol, 2002. **22**(3): p. 874-85.
66. Zeitlin, S.G., et al., *CENP-A is phosphorylated by Aurora B kinase and plays an unexpected role in completion of cytokinesis*. J Cell Biol, 2001. **155**(7): p. 1147-57.
67. Morrison, C., et al., *Proteomic analysis of human metaphase chromosomes reveals topoisomerase II alpha as an Aurora B substrate*. Nucleic Acids Res, 2002. **30**(23): p. 5318-27.
68. Goto, H., et al., *Aurora-B regulates the cleavage furrow-specific vimentin phosphorylation in the cytokinetic process*. J Biol Chem, 2003. **278**(10): p. 8526-30.
69. Cammareri, P., et al., *Aurora-a is essential for the tumorigenic capacity and chemoresistance of colorectal cancer stem cells*. Cancer Res, 2010. **70**(11): p. 4655-65.
70. Tanaka, T., et al., *Centrosomal kinase AIK1 is overexpressed in invasive ductal carcinoma of the breast*. Cancer Res, 1999. **59**(9): p. 2041-4.
71. Mathieu, R., et al., *[Study of the expression of Aurora kinases in renal cell carcinoma]*. Prog Urol, 2010. **20**(13): p. 1200-5.
72. Katayama, H., et al., *Aurora kinase inhibitors as anticancer molecules*. Biochim Biophys Acta, 2010. **1799**(10-12): p. 829-39.

73. Harrington, E.A., et al., *VX-680, a potent and selective small-molecule inhibitor of the Aurora kinases, suppresses tumor growth in vivo*. Nat Med, 2004. **10**(3): p. 262-7.
74. Lindemann, R.K., et al., *Histone-deacetylase inhibitors for the treatment of cancer*. Cell Cycle, 2004. **3**(6): p. 779-88.
75. Marks, P.A., et al., *Histone deacetylase inhibitors: discovery and development as anticancer agents*. Expert Opin Investig Drugs, 2005. **14**(12): p. 1497-511.
76. Choi, J.H., et al., *Expression profile of histone deacetylase 1 in gastric cancer tissues*. Jpn J Cancer Res, 2001. **92**(12): p. 1300-4.
77. Halkidou, K., et al., *Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer*. Prostate, 2004. **59**(2): p. 177-89.
78. Thiagalingam, S., et al., *Histone deacetylases: unique players in shaping the epigenetic histone code*. Ann N Y Acad Sci, 2003. **983**: p. 84-100.
79. Hymes, K.B., *The role of histone deacetylase inhibitors in the treatment of patients with cutaneous T-cell lymphoma*. Clin Lymphoma Myeloma Leuk, 2010. **10**(2): p. 98-109.
80. Ramalingam, S.S., et al., *Phase I study of vorinostat in patients with advanced solid tumors and hepatic dysfunction: a National Cancer Institute Organ Dysfunction Working Group study*. J Clin Oncol, 2010. **28**(29): p. 4507-12.
81. Mazumder, A., et al., *Vorinostat plus bortezomib for the treatment of relapsed/refractory multiple myeloma: a case series illustrating utility in clinical practice*. Clin Lymphoma Myeloma Leuk, 2010. **10**(2): p. 149-51.
82. Cenik, B., et al., *SAHA (VORINOSTAT) upregulates progranulin transcription: a rational therapeutic approach to frontotemporal dementia*. J Biol Chem, 2011.
83. Bhalla, K.N., *Epigenetic and chromatin modifiers as targeted therapy of hematologic malignancies*. J Clin Oncol, 2005. **23**(17): p. 3971-93.
84. Marks, P.A., et al., *Histone deacetylase inhibitors*. Adv Cancer Res, 2004. **91**: p. 137-68.
85. Mei, S., et al., *Role of histone deacetylase inhibitors in the treatment of cancer (Review)*. Int J Oncol, 2004. **25**(6): p. 1509-19.
86. Fiskus, W., et al., *Cotreatment with vorinostat enhances activity of MK-0457 (VX-680) against acute and chronic myelogenous leukemia cells*. Clin Cancer Res, 2008. **14**(19): p. 6106-15.
87. Dai, Y., et al., *Vorinostat synergistically potentiates MK-0457 lethality in chronic myelogenous leukemia cells sensitive and resistant to imatinib mesylate*. Blood, 2008. **112**(3): p. 793-804.
88. Okabe, S., et al., *Efficacy of MK-0457 and in combination with vorinostat against Philadelphia chromosome positive acute lymphoblastic leukemia cells*. Ann Hematol, 2010. **89**(11): p. 1081-7.
89. Pietsch, T., et al., *Characterization of the continuous cell line HepT1 derived from a human hepatoblastoma*. Lab Invest, 1996. **74**(4): p. 809-18.
90. Doi, I., *Establishment of a cell line and its clonal sublines from a patient with hepatoblastoma*. Gann, 1976. **67**(1): p. 1-10.
91. http://www.med4you.at/laborbefunde/techniken/durchflussszytometrie/lbef_durchflussszytometrie.htm.
92. <http://hikwww8.fzk.de:8080/imb/bionmr/teaching/Westernblot.pdf>.
93. Hishiki, T., et al., *Outcome of hepatoblastomas treated using the Japanese Study Group for Pediatric Liver Tumor (JPLT) protocol-2: report from the JPLT*. Pediatr Surg Int, 2011. **27**(1): p. 1-8.
94. von Schweinitz, D., et al., *Hepatocyte growth-factor-scatter factor can stimulate post-operative tumor-cell proliferation in childhood hepatoblastoma*. Int J Cancer, 2000. **85**(2): p. 151-9.
95. Posthumadeboer, J., et al., *WEE1 inhibition sensitizes Osteosarcoma to Radiotherapy*. BMC Cancer, 2011. **11**(1): p. 156.
96. Leijen, S., et al., *Abrogation of the G2 checkpoint by inhibition of Wee-1 kinase results in sensitization of p53-deficient tumor cells to DNA-damaging agents*. Curr Clin Pharmacol, 2010. **5**(3): p. 186-91.
97. Curia, M.C., et al., *Sporadic childhood hepatoblastomas show activation of beta-catenin, mismatch repair defects and p53 mutations*. Mod Pathol, 2008. **21**(1): p. 7-14.

98. Wirths, O., et al., *Overexpression of human Dickkopf-1, an antagonist of wingless/WNT signaling, in human hepatoblastomas and Wilms' tumors*. Lab Invest, 2003. **83**(3): p. 429-34.
99. Li, Y., et al., *VX680/MK-0457, a potent and selective Aurora kinase inhibitor, targets both tumor and endothelial cells in clear cell renal cell carcinoma*. Am J Transl Res, 2010. **2**(3): p. 296-308.
100. Castedo, M., et al., *Cell death by mitotic catastrophe: a molecular definition*. Oncogene, 2004. **23**(16): p. 2825-37.
101. Vader, G., et al., *The Aurora kinase family in cell division and cancer*. Biochim Biophys Acta, 2008. **1786**(1): p. 60-72.
102. Scharer, C.D., et al., *Aurora kinase inhibitors synergize with paclitaxel to induce apoptosis in ovarian cancer cells*. J Transl Med, 2008. **6**: p. 79.
103. Emanuele, S., et al., *SAHA induces apoptosis in hepatoma cells and synergistically interacts with the proteasome inhibitor Bortezomib*. Apoptosis, 2007. **12**(7): p. 1327-38.
104. Pathil, A., et al., *HDAC inhibitor treatment of hepatoma cells induces both TRAIL-independent apoptosis and restoration of sensitivity to TRAIL*. Hepatology, 2006. **43**(3): p. 425-34.
105. Eicher, C., et al., *Development of a drug resistance model for hepatoblastoma*. Int J Oncol, 2011. **38**(2): p. 447-54.

8 Abkürzungen

%	Prozent
° C	Grad Celsius
2D	zweidimensional oder Abkürzung für 2D-Kultur
3D	dreidimensional oder Abkürzung für 3D-Kultur
Abb.	Abbildung
ABCG2	Brustkrebs Resistenzprotein
ACT	Aktivator (EZ4U)
AFP	alpha- (α -) Fetoprotein
AG	Arbeitsgruppe
Ak	Antikörper
ALL	Akute lymphatische Leukämie
APS	Amoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
BCRP	engl. breast cancer resistance protein
bzw.	beziehungsweise
C°	Grad
CA	Californien
ca.	circa
CAPS	engl. 3-(Cyclohexylamino)-1-propanesulfonic acid
CDDP	Cisplatin
CDK	engl. cycline-dependent kinase
Chem.	Chemisch
Chr.	Chromosom
cm	Zentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CT	Computertomographie
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
dest.	destilliert

Abkürzungen

DEVD	Aminosäuresequenz aus Asparaginsäure-Glutaminsäure-Valin-Asparaginsäure
DMEM Kulturmedium	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	Dithiothreitol
engl.	englisch
FACS	engl. Fluorescence activated cell sorting
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis
FCS	fetales Kälberserum (engl. fetal calf serum)
FSC	Vorwärtsstreulicht (engl. Forward Scatter)
g	Fliehkraft
GPOH	Gesellschaft für Pädiatrische Onkologie und Hämatologie
gr.	griechisch
h	Stunde/n
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HB	Hepatoblastom
HCC	Leberzellkarzinom (engl. Hepatocellular carcinoma)
HCL	Salzsäure
HDAC	Histon-Deacetylase
HE	Hämatoxylin-Eosin
HepT1	humane Hepatoblastomzelllinie, embryonaler Typ
HGF	Hepatozyten-Wachstumsfaktor (engl. Hepatocyte growth factor)
HR	Hochrisiko
HRP	Meerrettichperoxidase (engl. horse radish peroxidase)
HuH6	humane Hepatoblastomzelllinie, gemischter Typ
IC ₅₀	mittlere inhibitorische Konzentration

Abkürzungen

IgG	Immunglobulin G
IF	Immunfluoreszenz
IHC	Immunhistochemie
in vitro	lateinisch: im Glas; organische Vorgänge außerhalb des Organismus
in vivo	lateinisch: im Lebendigen; organische Vorgänge innerhalb des Organismus
kDa	Kilodalton
Konz.	Konzentration
kryo	gr. Kälte
l	Liter
LA	Los Angeles
M	Molar
MA	Massachusetts
MDR	„Multidrug“-Resistenz, Mehrfachresistenz gegenüber Zytostatika
min	Minute/n
ml	Milliliter
mM	Millimolar
MRT	Magnetresonanztomographie
MTA	Medizinisch-technischer Assistent
ng	Nanogramm
NJ	New Jersey
nm	Nanometer
nM	Nanomolar
O ₂	Sauerstoff
p	Signifikanzwert (von engl. probability)
PBS	Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PBS-T	PBS-Tween
PE	Phycerythrin
PLADO	Kombinationschemotherapeutikum (Cisplatin/Doxorubicin)

Abkürzungen

PRETXT	engl. Pretreatment extent of disease; System zur Tumorklassifizierung
RT	Raumtemperatur
SDS	Natriumlaurylsulfat (engl. Sodium Lauryl Sulfate)
SIOP	Internationale Gesellschaft für pädiatrische Onkologie (franz. Societé Internationale d'Oncologie Pediatrique)
SIOPEL	SIOP-Studie
sog.	sogenannte
SR	Standardrisiko
SSC	Seitwärtsstreulicht (engl. Sidescatter)
SUB	Substrat (EZ4U)
TBS	engl. Tris-buffered saline
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Thr	Threonin
TKI	Tyrosinkinaseinhibitor
Tris	Tris(hydroxymethyl)-aminomethan
TX	Texas
Tyr	Thyrosin
u. a.	unter anderem
U/min	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
Wee1-I	Wee1-Inhibitor
Well	(engl. Vertiefung)
x	mal
μ	mikro
μl	Mikroliter
μm	Mikrometer
μM	Mikromolar

9 Danksagung

Ich möchte mich ganz herzlich bei allen Mitarbeitern des Forschungslabors für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die angenehme Atmosphäre sowie die gute Zusammenarbeit bedanken.

Mein Dank geht zudem an Herrn Prof. Dr. Jörg Fuchs für die Möglichkeit der Erstellung meiner Doktorarbeit in seiner Abteilung. Den unersetzlichen MTAs Julia Wenz und Bettina Kirchner danke ich sehr herzlich für ihre kompetente Unterstützung und die netten Gespräche, die den täglichen Gang ins Labor verschönt haben. Der Doktorandin Delia Hermann danke ich dafür, dass sie für Fragen immer ein offenes Ohr und meistens auch noch die passenden Antworten parat hatte. Ich möchte mich herzlich beim IZKF für die Aufnahme ins Promotionskolleg und die begleitende Unterstützung bedanken.

Mein besonderer Dank gilt meinem Betreuer Herr Prof. Dr. Sorin Armeanu-Ebinger, der mir immer mit Rat und Tat zur Seite stand. Seine unterstützende Hilfe in allen Belangen dieser Arbeit war beispiellos, und egal, ob es um methodische, technische oder konzeptionelle Probleme der Arbeit ging, fand Herr Armeanu-Ebinger meist eine Lösung.