

Technische Universität München  
II. Medizinische Klinik des Klinikums rechts der Isar  
(Direktor: Univ.-Prof. Dr. R. M. Schmid)

## **Epigenetische Regulation beim Magenkarzinom**

Lisa Johanna Merkl

Vollständiger Abdruck der von der Fakultät für Medizin der Technischen Universität München zur Erlangung des akademischen Grades eines Doktors der Medizin genehmigten Dissertation.

Vorsitzender: Univ.- Prof. Dr. E. J. Rummeny  
Prüfer der Dissertation: 1. Univ.- Prof. Dr. R. M. Schmid  
2. apl. Prof. Dr. H. Algül

Die Dissertation wurde am 19.03.2015 bei der Technischen Universität München eingereicht und durch die Fakultät für Medizin am 06.04.2016 angenommen.

# Inhaltsverzeichnis

<b>1</b>	<b>Einleitung</b>	<b>1</b>
1.1	Epigenetik	3
1.1.1	Histonmodifizierung	3
1.1.2	Bedeutung von HDACs für das Magenkarzinom	5
1.1.3	Wirkung von HDAC-Inhibitoren	5
1.1.4	Biomarker	10
1.2	Therapie des Magenkarzinoms	10
1.2.1	Anthrazykline	11
1.3	Kombinationstherapie	11
1.4	Mausmodell	12
<b>2</b>	<b>Zielsetzung</b>	<b>14</b>
<b>3</b>	<b>Material</b>	<b>15</b>
3.1	Allgemeines	15
3.2	Western Blot	16
3.3	Zelllinien	16
3.4	Zellkultur	16
3.5	Enzyme	17
3.6	Antikörper	17
3.6.1	Primäre Antikörper	17
3.6.2	Sekundäre Antikörper	18
3.7	Kits	18
3.8	Primer	19
3.9	Geräte	19
<b>4</b>	<b>Methoden</b>	<b>21</b>
4.1	Zellkultur	21
4.1.1	Kultivierung von Zelllinien	21
4.1.2	Reagenzien	21
4.2	Zelluläre Experimente	21
4.2.1	MTT-Assay	21
4.2.2	Colony Formation Assay	22
4.2.3	HDAC-Enzymaktivitätsassay	22
4.2.4	Transiente Transfektion von Zellen	23
4.3	Proteinanalyse	23
4.3.1	Proteinpräparation	23
4.3.2	Proteinbestimmung	24
4.3.3	Western Blot	24
4.4	Nukleinsäure basierte Verfahren	26
4.4.1	RNA-Isolierung	26
4.4.2	Quantitative Nukleinsäureanalyse	26
4.4.3	cDNA-Synthese	27
4.4.4	Quantitative realtime PCR (Q-PCR)	27
4.5	Genotypisierung	28
4.5.1	Phenol-Chloroform-Extraktion	28

4.5.2	PCR	28
4.5.3	DNA-Elektrophorese	28
4.6	Humane Tumorproben	29
4.7	Tierversuche	29
4.7.1	Kryokonservierung / Kryoschnitte	30
4.8	Immunhistochemie	30
4.9	Ficoll-Paque PLUS	31
4.10	Statistische Analysen	32
<b>5</b>	<b>Ergebnisse</b>	<b>33</b>
5.1	Expression von HDAC2	33
5.1.1	Zelllinien	33
5.1.2	Humane Tumorproben	34
5.1.3	Mausmodell	36
5.2	Wirkung von LBH589	38
5.2.1	Zelllinien	38
5.2.2	Enzymaktivitätsassay	43
5.2.3	HDAC Degradation	44
5.2.4	Acetylierung	44
5.3	Reaktivierung von p21	47
5.4	Proteindegradation	47
5.4.1	Western Blot	48
5.5	HDAC Knockdown	49
5.5.1	Verminderte Proliferation	49
5.5.2	Verminderte Chemoresistenz	52
5.6	Kombinationstherapie	53
5.6.1	Anthrazyklin-Resistenzgene	53
5.6.2	MTT-Assay	54
5.7	LBH-Monotherapie <i>in vivo</i>	56
5.7.1	Kombinationstherapie <i>in vivo</i>	57
<b>6</b>	<b>Diskussion</b>	<b>62</b>
<b>7</b>	<b>Zusammenfassung</b>	<b>73</b>
<b>8</b>	<b>Literaturverzeichnis</b>	<b>75</b>
<b>9</b>	<b>Abkürzungsverzeichnis</b>	<b>83</b>
<b>10</b>	<b>Danksagung</b>	<b>85</b>

## 1 Einleitung

Das Magenkarzinom ist weltweit die zweithäufigste Todesursache unter den Tumorerkrankungen. Die Diagnose erfolgt oft in einem fortgeschrittenen Tumorstadium, in dem kurative Therapien erfolglos bleiben und der Nutzen systemischer Chemotherapien beschränkt ist. Das 5-Jahres-Überleben dieser Patienten beträgt weniger als 20 %, was unter anderem auf Chemotherapeutika-Resistenzen zurückzuführen ist (Correa, 2004; Jemal et al., 2010). In lokalisierten Tumorstadien mit kurativer Zielsetzung ist die chirurgische Resektion mit perioperativer Chemotherapie beim Magenkarzinom nach wie vor die Therapie der Wahl und verspricht realistische Heilungschancen (Cunningham et al., 2006). Dennoch kommt es bei mehr als der Hälfte der Patienten mit potentiell kurativer Therapie innerhalb eines Jahres zu einem Rezidiv (Weichert et al., 2008). Zwar zeigt die Chemotherapie in randomisierten Studien für fortgeschrittene Tumorstadien einen positiven Effekt auf das Gesamtüberleben und die Lebensqualität, jedoch weisen bereits 40 % der Patienten nach *first-line* Chemotherapie eine Tumorprogression auf (Glimelius et al., 1997; Chong et al., 2005). Die Prognose ist hierbei mit einem 5-Jahresüberleben von 3 % besonders schlecht, was vor allem der Ausbildung von Resistenzmechanismen gegenüber konventionellen Chemotherapeutika geschuldet ist. Durch eine Kombination verschiedener Chemotherapeutika wird versucht dies zu umgehen, woraus jedoch zwangsläufig eine stark erhöhte Toxizität für den Patienten resultiert. Eine frühe Diagnose des Magenkarzinoms wird vor allem durch unspezifische oder gar fehlende Symptome erschwert; ebenso zeigen Früherkennungsmaßnahmen wie die Analyse von bekannten Tumormarkern nur geringen Nutzen. So hat der derzeit am häufigsten angewandte Marker CA72-4 eine Sensitivität von 50 % und nur für die postoperative Nachsorge eine Bedeutung (Lai et al., 2002). Um eine Reduktion der Sterblichkeit auch in diesen fortgeschrittenen Tumorstadien zu erreichen, müssen einerseits geeignete Marker für die frühe Diagnostik etabliert und andererseits multimodale, personalisierte Behandlungskonzepte entwickelt werden.

Das Magenkarzinom ist die vierthäufigste Tumorerkrankung weltweit und betrifft jedes Jahr rund eine Million Menschen (Kamangar et al., 2006). Die Inzidenz variiert stark in Abhängigkeit der geographischen Region, wobei die Rate der Neuerkrankungen mit bis zu 69/100.000 in Asien besonders hoch ist und das Magenkarzinom dort sogar die häufigste Tumorentität darstellt (Yamaoka et al., 2008). Das Verhältnis zwischen Männern und Frauen beträgt 2:1. Im Jahr 2012 wurden in den USA 21,320 Patienten mit einem Magenkarzinom diagnostiziert, von denen rund 10,540 (entspricht 49 %) an der Erkrankung starben (Siegel et al., 2012). Während in Japan dank intensiver Krebsvorsorge Überlebensraten von 52 % erreicht werden, ist das Überleben in Europa und den USA mit 20–25 % noch immer niedrig (Hartgrink et al., 2009). Ermutigende Tendenzen sind dennoch erkennbar: so führen

Verbesserungen des hygienischen Standards und der Ernährungssituation seit Jahren zu einem Rückgang der Inzidenz des Magenkarzinoms. Von Bedeutung sind hierbei zweifellos auch niedrigere Infektionsraten mit *Helicobacter pylori* auf Grund verbesserter Interventionsmöglichkeiten wie der Eradikation oder Impfung. Trotz dieser positiven Entwicklung ist eine Zunahme des proximalen Typs des Magenkarzinoms in den letzten Jahren besorgniserregend (Henson et al., 2004). Dies dürfte vor allem dem Anstieg von Zivilisationskrankheiten wie Übergewicht und gastroösophagealem Reflux geschuldet sein.

Die Mehrzahl der Tumoren des Magens sind Adenokarzinome, welche anhand histologischer Gesichtspunkte klassifiziert werden können (el-Rifai et al., 2002). So führte Lauren 1965 die Unterscheidung in zwei Subtypen ein, den intestinalen und diffusen Typ. Der intestinale Typ zeichnet sich durch glanduläre Strukturen und polypöses Wachstum aus und zeigt einen guten Differenzierungsgrad; im Gegensatz zum diffusen Typ, der durch ein infiltrierendes Wachstum mit einer schlechten Prognose gekennzeichnet ist (Lauren, 1965). Obwohl die Infektion mit *H. pylori* bei der Pathogenese des Magenkarzinoms im Vordergrund steht, bleibt doch festzuhalten, dass die Ätiologie ein multifaktorielles Geschehen ist (Uemura et al., 2001). Während Ernährungsfaktoren und die *H. pylori*-Gastritis das Risiko für die Entwicklung eines distalen Karzinoms erhöhen, spielen Übergewicht und ösophagealer Reflux in der Karzinogenese des Kardiakarzinoms eine wichtige Rolle (Crew et al., 2006). Der amerikanische Pathologe Correa beschrieb in der sogenannten Correa-Kaskade die basalen Schritte der Entwicklung des intestinalen Karzinoms als eine Sequenz aus Atrophie, intestinaler Metaplasie, Dysplasie und Karzinom, wohingegen Tahara ein Modell vorschlug, nach dem intestinale und diffuse Karzinome entweder *de novo* oder aus Vorläuferläsionen entstehen (Correa et al., 1975; Tahara, 2004). Beide Ansätze berücksichtigen jedoch nur die zelluläre Ebene und beschreiben nicht die eigentliche Pathogenese.

Das Magenkarzinom entwickelt sich als Folge einer Akkumulation genetischer Schäden. Eine Häufung von Mutationen führt schließlich zu multiplen genetischen Veränderungen in Onkogenen, Tumorsuppressorgenen, Zellzyklusregulatoren und Zell-Adhäsionsmolekülen und begünstigt so den Prozess der Karzinogenese (Hamilton et al., 2006; Vogiatzi et al., 2007). Speziell beobachtet werden beim Magenkarzinom unter anderem die Überexpression verschiedener Onkogene, wie *v-erb-b2 erythroblastic leukemia viral oncogene homolog 2*, *neuro/glioblastoma derived oncogene homolog (c-ERBB2)*, *mesenchymal epithelial transition factor (c-MET)* oder *K-SAM*, sowie die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen, wie *E-Cadherin (CDH1)*, *tumor protein p53 (TP53)* und *cyclin-dependent kinase inhibitor 1A (CDKN1A; p21)* (Stock et al., 2005).

Die Entstehung des Magenkarzinoms folgt also einem komplexen und bisher nicht komplett verstandenen Prozess, der durch verschiedene genetische und epigenetische Alternationen

initiiert wird. Der Katalog an Genveränderungen wächst schnell, was zu weiterer Komplexität der Erkrankung führt. Multifaktorielle Modelle, welche das Zusammenwirken aus Umweltfaktoren und einer Vielzahl von Veränderungen in unterschiedlichen Genen beschreiben, passen daher beim Magenkarzinom besser als sogenannte *single major gene models*, in denen die Mutation eines einzigen Gens die Karzinogenese definiert.

## 1.1 Epigenetik

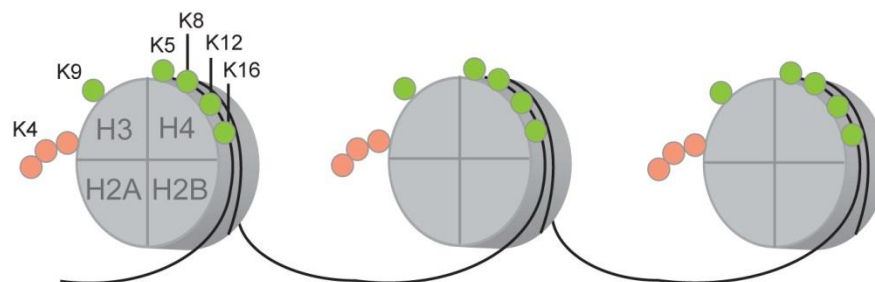
Unter Epigenetik versteht man die mitotisch vererbare Veränderung der Genexpression ohne eine Modifikation der DNA-Sequenz (Holliday, 1987). Der Begriff wurde ursprünglich 1942 durch C. H. Waddington geprägt und sollte erklären, wieso genetische Modifikationen nicht zwangsläufig zu phänotypischen Veränderungen führen und inwieweit die Interaktion von Genen mit ihrer Umwelt zur Prägung eines Phänotyps beiträgt (Waddington, 2012). Die wichtigsten epigenetischen Regulationsmechanismen beinhalten verschiedene Histonmodifizierungen und die DNA Methylierung spezifischer Promoter- und Genombereiche. Während die Karzinogenese über lange Zeit als ein Prozess rein genetischen Ursprungs betrachtet wurde, wird zunehmend klar, dass die Epigenetik an der Entstehung und Progression von Karzinomen maßgeblich beteiligt ist (Esteller, 2008; Sharma et al., 2010). Die potentielle Reversibilität dieser Veränderungen macht dieses Gebiet interessant für eine mögliche medikamentöse Therapie und bietet pharmakologische Angriffspunkte für epigenetische Medikamente.

### 1.1.1 Histonmodifizierung

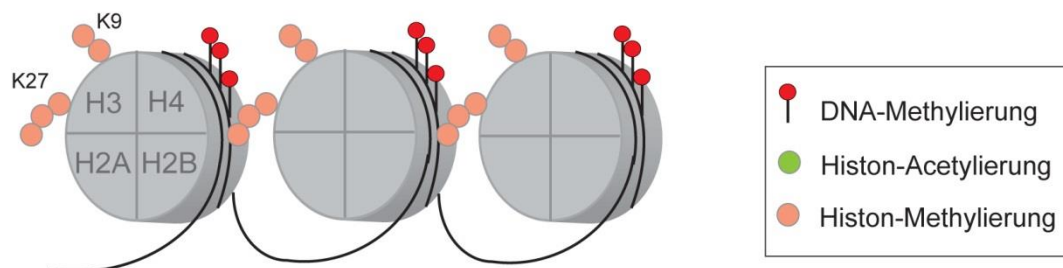
Die primäre Struktur des Chromatins ist das Nukleosom (Kornberg, 1974). Es besteht aus einem Histon-Oktamer mit 146 nahezu zweimal darum gewundenen DNA-Basenpaaren (Luger et al., 1997). Dieses Nukleosom stellt gleichsam die erste „Verpackungsstufe“ der DNA in eukaryotischen Zellen dar, bei der sich das Chromatin infolge des Ladungsunterschiedes um die Histone windet. Das Chromatin kann in zwei verschiedenen Zuständen vorkommen: Einer offenen Konformation, bei der die DNA für die Transkriptionsfaktoren zugänglich ist und einer geschlossenen Konformation, die eine Repression der Transkription bedingt. Für Histone sind eine Reihe verschiedener Modifikationen beschrieben: Methylierung, Ubiquitylierung, Sumoylierung, Poly-ADP-Ribosylierung, Carbonylierung, Phosphorylierung, Glykosylierung sowie die Acetylierung (Mulero-Navarro et al., 2008). Die post-translationale, reversible Acetylierung N-terminaler Lysinreste ist eine wichtige epigenetische Modifikation bei der Regulation der Genexpression. Durch die gegensätzliche Aktivität von Histon-Acetyltransferasen (HATs) und Histondeacetylasen (HDACs) kann der Acetylierungsstatus der Histone bestimmt werden. Die Übertragung von Acetylgruppen auf spezifische Lysinreste bewirkt eine Neutralisierung der positiven Ladung der Histonproteine und somit den Verlust der Interaktion mit der negativ geladenen DNA. Auf diese Weise

induziert die Acetylierung von Histonen eine offene Chromatinstruktur mit verbesserter Zugänglichkeit der DNA für regulatorische Proteine und eine Aktivierung der Genexpression. Umgekehrt führt die Histon-Deacetylierung zu einer Kondensation des Chromatins und folglich zu einer geschlossenen Struktur mit transkriptioneller Repression (Abbildung 1). Diese Modifikationen betreffen vor allem Gene, welche überwiegend in die Regulation der Proliferation, Angiogenese, Differenzierung, Invasion und Metastasierung bei der Tumor-entstehung eingreifen (Minucci et al., 2006).

offene Chromatinkonformation



geschlossene Chromatinkonformation



**Abbildung 1:** Darstellung des Einflusses von Acetylierung und Methylierung auf die Histone H3 und H4. Das spezifische Muster bedingt entweder eine offene (obere Teilabbildung) oder geschlossene Chromatinkonformation (untere Teilabbildung). Entnommen aus (Gruner, 2010).

Die Histon-Acetylierung und Chromatinmodulierung spielen somit eine bedeutende Rolle im Hinblick auf die Tumorentstehung und -progression. Zudem wird diskutiert, ob epigenetische Veränderungen das Ansprechen auf Chemotherapie verschlechtern. Eine mögliche Erklärung hierfür wäre, dass kondensiertes Chromatin für DNA-interkalierende Chemotherapeutika schlechter zugänglich ist und der mögliche Effekt somit geringer ausfällt (Mutze et al., 2010).

Beim Menschen sind bisher 18 verschiedene HDAC Isoformen beschrieben worden, die anhand ihrer funktionellen Kriterien und strukturellen Homologien in vier Klassen unterteilt werden können. Am besten charakterisiert und für die Regulation der Genexpression am stärksten relevant sind die NAD<sup>+</sup>-abhängigen Klasse I HDACs: HDAC1, 2, 3 und 8. Sie sind vor allem im Kern lokalisiert und spielen eine primäre Rolle bei der Zellproliferation und dem

Zellüberleben (Marks et al., 2009). Die pathologische Aktivität von HDACs kann ernsthafte Erkrankungen bedingen, darunter Muskeldystrophie, immunologische Störungen, kardiale Hypertrophie, Beeinträchtigung des Gedächtnisses sowie die Ausbildung von Tumoren (Trivedi et al., 2007; Guan et al., 2009). Im Mausmodell konnte überdies gezeigt werden, dass eine HDAC1 Deletion zu früher embryonaler Letalität führt (Lagger et al., 2002). Die Expression einer katalytisch inaktiven Form von HDAC2 hat ebenfalls pränatalen Tod oder, sofern dieses Stadium überlebt wird, eine reduzierte Fertilität, kleineren Körperbau und kardiale Anomalien zur Folge (Zimmermann et al., 2007; Kramer, 2009). Der Zusammenhang zwischen einer veränderten HDAC Aktivität und Krebs ist bereits bekannt: So ist für eine Vielzahl von Tumoren, darunter Darm, Brust, Prostata und Magen, eine Korrelation mit der Überexpression von HDAC Klasse I und eine erhöhte HDAC2 Expression als unabhängiger Marker einer schlechten Prognose beschrieben (Bolden et al., 2006; Kramer, 2009).

### **1.1.2 Bedeutung von HDACs für das Magenkarzinom**

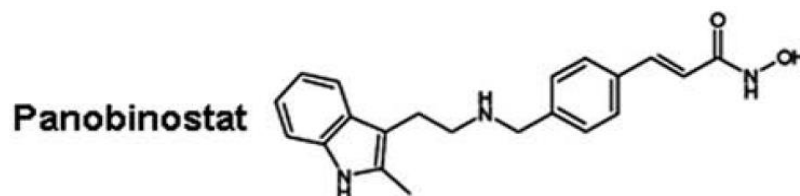
Die Expression und Aktivität von HDACs Klasse I spielen ebenfalls eine bedeutende Rolle bei der Entwicklung, Progression und Prognose des Magenkarzinoms. So konnten Weichert *et al.* zeigen, dass die Überexpression von HDACs Klasse I im Magenkarzinom mit dem Ausmaß lymphogener Tumorausbreitung assoziiert ist und ein gesteigerter HDAC2 Proteinlevel zu einem entdifferenzierten Tumor-Phänotyp beiträgt. Die zentrale Aussage ist jedoch zweifellos, dass eine hohe HDAC Klasse I, beziehungsweise generell erhöhte HDAC2 Expression, in signifikanter Weise für ein reduziertes Gesamtüberleben verantwortlich ist und damit einen unabhängigen prognostischen Marker darstellt (Weichert et al., 2008). Diese Beobachtungen werden von Yasui *et al.* gestützt. Deren Arbeit konnte eine reduzierte Expression des acetylierten Histons H4 in der Mehrheit von Magen- und Kolonkarzinomen zeigen, was auf eine globale Hypoacetylierung in Tumorzellen hinweist. Außerdem ist eine reduzierte Histonacetylierung in signifikantem Maße mit fortgeschrittenem Tumorstadium, der Tiefe der Tumordinvasion und lymphogener Metastasierung assoziiert und somit nicht nur an der Tumorentstehung, sondern auch an Invasion und Metastasierung beteiligt (Ono et al., 2002; Yasui et al., 2003; Song et al., 2005).

### **1.1.3 Wirkung von HDAC-Inhibitoren**

Im Prozess der Karzinogenese kann eine veränderte HDAC Expression bereits früh beobachtet werden (Fraga et al., 2005). Zusätzlich können HDACs als potentielle pharmakologische Angriffspunkte für die Beeinflussung epigenetischer Veränderungen dienen, welche im Zusammenhang mit Karzinomen stehen, da diese epigenetischen Modifikationen im Gegensatz zu Mutationen reversibel sind. Die logische Konsequenz ist die Entwicklung und Anwendung von HDAC-Inhibitoren (HDACi). Diese haben bereits in zahlreichen präklinischen Studien ihre potentielle antitumorale Wirkung unter Beweis gestellt



und gegenüber einigen malignen hämatologischen Erkrankungen aber auch bei soliden Tumoren Therapieerfolge gezeigt. So wurde Vorinostat (SAHA) im Jahr 2006 als erster HDAC-Inhibitor für die Therapie des kutanen T-Zell-Lymphoms zugelassen (Mann et al., 2007). Das in dieser Arbeit verwendete Medikament Panobinostat (LBH589, Abbildung 2) wurde von *Novartis, Basel, Schweiz* entwickelt. Es gehört zur Gruppe der Hydroxamsäure-Analoga, welche die Zink-abhängigen HDACs (HDAC Klasse I, II und IV) inhibieren (Atadja, 2009).



**Abbildung 2:** Die chemische Struktur von Panobinostat (LBH589), entnommen aus (Atadja, 2009).

In Studien konnte unter Behandlung mit LBH589 ein signifikanter Therapieerfolg für AML, Hodgkin-Lymphom und das multiple Myelom aber auch für gastrointestinale Stromatumoren gezeigt werden (Floris et al., 2009; Prince et al., 2009). Darüber hinaus wird unter der Leitung von Prof. Ebert seit Januar 2009 eine Phase II AIO-Studie unter dem Titel „*An open-label, uncontrolled phase II trial of HDAC inhibitor LBH589 in patients with chemo-refractory metastatic gastric cancer overexpressing histone deacetylases*“ an den Unikliniken Mannheim und München (Klinikum rechts der Isar) durchgeführt. Dabei wird der HDAC-Expressionsstatus aus Tumorbiopsien der Patienten immunhistochemisch bestimmt und vor Therapiebeginn sowie während der Behandlung in regelmäßigen Abständen Plasma, Serum und Lymphozyten zur Biomarker-Bestimmung gewonnen. Bis Februar 2011 wurden 32 Patienten auf erhöhte Expression von HDAC Klasse I getestet, wobei ca. 25 % der Patienten HDAC-positiv waren. Letztendlich wurden bis zu diesem Zeitpunkt 6 Patienten in die Studie eingeschlossen. und es konnte bei einem Patienten ein stabiler Krankheitszustand (*stable disease*) unter LBH589 Therapie erzielt werden.

Im Folgenden soll eine Übersicht über die verschiedenen Wirkungsweisen von HDACi gegeben werden:

**Effekte auf Genexpression:** HDACi vermitteln einen komplexen Einfluss auf die globale Genexpression. Durch die Acetylierung der Histone kommt es, wie bereits in 1.1.1 beschrieben, zu einer Relaxierung des Chromatins und konsekutiv zu einer Re-Expression inaktivierter Gene. Zwar immer noch kontrovers diskutiert, geht man heute jedoch davon aus, dass ungefähr 2 - 20 % der exprimierten Gene durch HDACi beeinflusst werden (Villar-Garea et al., 2004; Marks et al., 2009). Eines der am häufigsten durch HDACi induzierten Gene ist der Cyklin-abhängige Kinase Inhibitor p21 (*CDKN1A*) (Richon et al., 2000). Die

Induktion dieses Tumorsuppressorgens geschieht unabhängig von p53 *in vitro* und *in vivo* und korreliert mit dem Anstieg acetylierter Histone (Marks et al., 2009). Speziell für Magenkarzinomzellen konnte eine Assoziation zwischen p21 Expression und ausgeprägter Histonacetylierung gezeigt werden (Shin et al., 2000).

**Induktion von Apoptose:** Ein wichtiger Aspekt des therapeutischen Potentials von HDACi ist die Vermittlung einer Tumorzell-spezifischen Induktion pro-apoptotischer Gene. Die Apoptose kann dabei über zwei bekannte Signalwege gesteuert werden. Im extrinsischen Signalweg erfolgt die Aktivierung von Todesrezeptoren der TNF-Rezeptor Superfamilie und deren Liganden (TNF, TRAIL, TNF $\alpha$  und Fas/FasL). Dieser Mechanismus ist auf Tumorzellen beschränkt, so dass in normalen Zellen weder eine Hochregulation von Todesrezeptoren noch von deren Liganden beobachtet werden kann (Marks, 2010). Dabei wird durch HDACi eine Hochregulation von Todesrezeptoren und deren Liganden in den Tumorzellen vermittelt. Die Induktion des intrinsischen Signalwegs erfolgt über eine Suppression anti-apoptotischer und eine Aktivierung pro-apoptotischer Proteine der Bcl-2 Familie (Marks et al., 2009). Über die Freisetzung von Cytochrom C aus dem Mitochondrium und die Aktivierung der Caspase Kaskade kommt es schließlich zum programmierten Zelltod.

**Einfluss auf Zellzyklusprogression:** HDACi führen zu Differenzierung und Zell-Zyklus-Arrest (Burgess et al., 2004). Während ein G1/S Arrest im Wesentlichen über *CDKN1A* Induktion vermittelt wird, ist der Mechanismus, der für den G2/M Arrest verantwortlich ist, bisher kaum verstanden (Villar-Garea et al., 2004; Bolden et al., 2006).

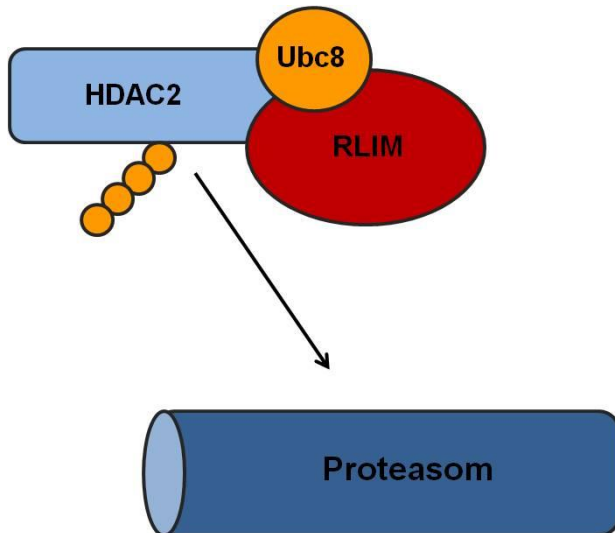
**Tumervaskularisation:** Solide Tumoren sind in entscheidendem Maße abhängig von der Angiogenese. Im Tiermodell konnte für HDACi eine anti-angiogene Wirkung gezeigt werden, wobei die Inhibition der Neovaskularisation über eine Suppression von Hypoxie-responsiven Tumorsuppressorgenen, insbesondere HIF1 $\alpha$ , vermittelt wurde (Marks, 2010).

**Immunmodulation:** HDACi können die Immunantwort gegenüber dem Tumor durch zahlreiche Mechanismen beeinflussen: durch Änderung der Immunzellaktivität oder Änderung der Zytokin-Produktion, Erhöhung der Tumorummunogenität durch Stimulation von MHC I und II Expression und Adhäsionsmolekülen (CD40, 80, 86) (Schrump, 2009). Dabei kommt es durch HDACi zu einer Hochregulation von bestimmten Genen (u. a. NY-ESO-1 und MAGE). Diese codieren für Tumorantigene, wobei durch die Aktivierung dieser Antigene die Erkennung und somit auch die spätere Lyse der Tumorzellen durch zytotoxische T-Zellen erleichtert werden.

**Effekte auf Nicht-Histon Proteine:** Wie bereits in 1.1.1. beschrieben, können auch zahlreiche Nicht-Histon Proteine durch Deacetylierung verändert werden und somit als pharmakologische Angriffspunkte von HDACi im Hinblick auf die Behandlung von Tumorerkrankungen gelten. Darunter sind Transkriptionsfaktoren, Signaltransduktionsmediatoren, DNA-Reparatur-Enzyme, Chaperon Proteine, Entzündungsmediatoren und strukturelle sowie virale Proteine (Marks et al., 2009). Eine Acetylierung der Nicht-Histon Proteine kann die Stabilität dieser Proteine verändern und sich außerdem auf ihre Protein-Protein-Interaktionsfähigkeit auswirken, ohne dass ein direkter Effekt auf die Genexpression vermittelt wird.

**Proteindegradation:** Die proteasomale Degradation von Proteinen in der Zelle ist ein Prozess, der für die Karzinogenese von erheblicher Relevanz ist und daher als Angriffspunkt für die Therapie von Krebserkrankungen gilt. Hierbei werden die Proteine per Polyubiquitylierung zum 26S Proteasom gebracht, ein Multiprotein Komplex, der den proteolytischen Abbau von Proteinen katalysiert. Die Ubiquitylierung wird durch drei hierarchisch organisierte Enzyme vorgenommen: Ein Ubiquitin-aktivierendes Enzym (E1), eine Ubiquitin-Konjugase (E2) und eine Ubiquitin-Ligase (E3), wobei letztere Substratspezifität vermittelt (Buchwald et al., 2009). HDACi können die Degradation bestimmter Onkoproteine induzieren, indem sie die Genexpression spezifischer Ubiquitylierungsenzyme positiv beeinflussen. Eine gesteigerte Proteindegradation unter HDACi konnte zuerst für HDAC2 unter der Behandlung mit Valproat (VPA) nachgewiesen werden. Es zeigte sich, dass die E2-Ubiquitin-Konjugase (E2 ubiquitin conjugase, Ubc8) und die zugehörige E3-Ligase (E3 ubiquitin ligase, RLIM) für die Polyubiquitylierung und proteasomale Degradation von HDAC2 obligatorisch sind (Abbildung 3) (Kramer et al., 2003). Eine durch HDACi Therapie vermittelte gesteigerte Expression der Enzyme Ubc8 und RLIM resultiert folglich in einen vermehrten proteasomalen Abbau von HDAC2 und führt letztendlich zur Apoptose. Zusammenfassend ist festzuhalten, dass Polyubiquitylierung und proteasomale Degradation, zumindest via RLIM, einen Isoform-selektiven Mechanismus für die Herunterregulation von HDAC2 darstellen. Die Hypothese der HDAC2-Spezifität von RLIM wird unterstützt durch die Tatsache, dass RLIM zwar mit Antikörpern gegen HDAC2 nicht jedoch mit Antikörpern gegen HDAC1 und 3 ko-präzipitiert. Während HDAC2 in den Versuchen also degradiert wurde, änderten sich die Proteinkonzentrationen der anderen analysierten HDACs (HDACs 1, 3, 4, 5 und 8) nicht (Kramer et al., 2003). Inwieweit allerdings HDACi induzierte Proteindegradation mittels Ubc8 und RLIM auf HDAC2 beschränkt bleibt, muss in Zukunft noch gezeigt werden.

In dieser Arbeit bleibt zu beweisen, ob die Induktion von Ubc8 und RLIM auch unter LBH589 Therapie zu beobachten ist und damit eine Erklärung für die Wirkungsweise dieses Medikamentes darstellt.



**Abbildung 3:** Modell der proteasomalen Degradation von HDAC2 mittels der E3-Ligase RLIM. Modifiziert nach (Buchwald et al., 2009; Kramer, 2009).

**Tumorselektivität:** *In vitro* Studien konnten zeigen, dass Tumorzellen eine zehnfach gesteigerte Sensitivität gegenüber einer HDACi-Behandlung im Vergleich zu normalen Zellen aufweisen (Ungerstedt et al., 2005). Diese Beobachtung lässt die Schlussfolgerung zu, dass HDACi eine selektive Anti-Tumorzellaktivität besitzen. Möglicherweise wird das Epigenom durch den Transformationsprozess so verändert, dass sonst stillgelegte Gene durch HDACi aktiviert werden können (Bolden et al., 2006). Die Selektivität erklärt sich also eventuell durch fundamentale epigenetische Unterschiede zwischen transformierten Tumorzellen und normalen Zellen, die ein transkriptionell unterschiedliches Ansprechen gegenüber HDACi zur Folge haben. Auch in klinischen Studien konnte nachgewiesen werden, dass HDACi bereits bei Konzentrationen, die nur minimale Toxizität für den Patienten bedeuten, eine potente Antitumoraktivität entwickeln (Bolden et al., 2006). Gerade im Vergleich mit konventionellen Zytostatika, welche ausschließlich auf proliferierende Zellen wirken, besitzen HDACi zahlreiche Vorteile. So sind diese in der Lage auch in ruhenden, nicht-proliferierenden Tumorzellen, wie sie häufig im Inneren solider Tumoren vorkommen, Apoptose auszulösen (Burgess et al., 2004). Eine mögliche Erklärung für diese präferentielle tumorizide Wirkung könnte die unterschiedliche Reaktion von Tumorzellen auf oxidativen Stress bieten. So bewirken HDACi eine Akkumulation von ROS (*reactive oxygen species*) in Tumorzellen, die zur Apoptose führt (Dokmanovic et al., 2005). Unter dem Überbegriff ROS werden u. a. Sauerstoffionen, freie Radikale und Peroxide zusammengefasst, die auf Grund ihres ungepaarten Valenzelektrons hochreaktiv sind und daher eine wichtige Rolle in Zell-signalwegen spielen. Bei umgebungsbedingtem Stress können die ROS-Level dramatisch ansteigen und Schäden bedingen, die zum Zelltod führen. Hierbei bleibt unklar, ob die Akkumulation der freien Radikale Folge einer direkt durch HDACi induzierten Produktion oder einer veränderten Expression von ROS-Regulationsproteinen ist (Bolden et al., 2006).

Obwohl der pharmakologische Effekt von HDACi sich vorrangig auf veränderte Zellen konzentriert, sind Nebenwirkungen zu erwarten. Am häufigsten werden dabei Thrombozytopenie, Schwindel, Fatigue, kardiale Arrhythmien und Diarrhoe genannt, wobei aber generell eine gute Verträglichkeit beobachtet wird (Prince et al., 2009).

Angesichts der aufgezeigten pleiotropen Effekte von HDACi ist die Identifizierung eines einzigen molekularen Signalwegs als Ursache der antitumoralen Wirkung unwahrscheinlich. Nichtsdestotrotz ist festzuhalten, dass epigenetische Veränderungen an der Tumorentstehung, wie auch an Invasion und Metastasierung beteiligt sind. Mit Hilfe von HDACi, die diese aberranten Genexpressionsmuster aufheben und eine Tumorzell-selektive Apoptose herbeiführen können, ist somit eine vielversprechende Alternative in der Behandlung von Krebs auch bei fortgeschrittenen und metastasierten Stadien gegeben.

#### **1.1.4 Biomarker**

Die Identifizierung und Entwicklung von Biomarkern, die eine Voraussage bezüglich des Ansprechens auf eine Therapie mit HDACi treffen könnten, besitzen ein immenses klinisches Potential. Mit ihrer Hilfe könnten geeignete Patienten identifiziert, Pharmakokinetik und -dynamik beobachtet und die entsprechende Modulation (in diesem Falle die Acetylierung) bestätigt werden. Zur Identifizierung responsiver Patienten ist eine Messung der HDAC-Enzyme selbst naheliegend. Die Beobachtung, dass hohe HDAC-Level mit einer schlechten Prognose korrelieren, legt nahe, dass diese Patienten am meisten von einer Therapie mit einem HDACi profitieren können. Durch die Feststellung ihres HDAC-Status mittels Immunhistochemie können die geeigneten Subgruppen frühzeitig ausgewählt und entsprechend behandelt werden.

Sinnvoller Marker der biologischen Aktivität von HDACi ist die Akkumulation von acetylierten Histonen in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs). Er ist einfach aus dem Blut zu bestimmen und zeigt die direkte Wirkung der HDACi, nämlich die Acetylierung, welche bereits kurz nach der Gabe beobachtet werden kann. Allerdings korreliert dieser Marker nicht mit der therapeutischen Effizienz, sondern ist ein Indikator für die biologische Aktivität und das Erreichen eines pharmakologisch wirksamen Levels (Marks et al., 2009; Stimson et al., 2009).

## **1.2 Therapie des Magenkarzinoms**

Für das potenziell resektable Magenkarzinom stellt die chirurgische Resektion mit regionaler Lymphadenektomie die einzige Möglichkeit zur kurativen Behandlung dar und bildet somit die Standardtherapie für lokalisierte Karzinome (Moehler et al., 2011). Zusätzlich wird allen Patienten auf Grundlage der sogenannten MAGIC-Studie eine perioperative Chemotherapie angeboten. In dieser konnten Cunningham *et al.* nach 5 Jahren eine extrapolierte

Verbesserung des Gesamtüberlebens um 12.5 % nachweisen (Cunningham et al., 2006). Als Chemotherapie-Schema wurde das sogenannte ECF-Regime mit einer Kombination aus infusionalem 5-Fluorouracil (5-FU), Cisplatin und Epirubicin verwendet. Gerade bei lokal fortgeschrittenen Tumoren wird ein signifikanter Überlebensvorteil erzielt, der bisher durch keine andere multimodale Therapie im Vergleich zu alleiniger Chirurgie erreicht wurde.

In der Palliativsituation sind die therapeutischen Möglichkeiten für Patienten mit fortgeschrittenem oder metastasiertem Krankheitsstatus beschränkt. Studien zeigen zwar im Vergleich zur *best supportive care* für die systemische Chemotherapie eine signifikante Verbesserung des Gesamtüberlebens (7,5 - 12 Monate versus 3 - 4 Monate) sowie auch einen längeren Erhalt der Lebensqualität und eine Verbesserung des Allgemeinzustandes (Glimelius et al., 1997; Wagner et al., 2006). Nichtsdestotrotz tritt bei fast allen Patienten im Verlauf der Behandlung mit konventionellen Chemotherapeutika eine Tumorprogression auf. Ein weiteres Problem ist die Toxizität der Dreifachkombination, insbesondere bei älteren Patienten (Van Cutsem et al., 2006). Es muss also festgestellt werden, dass die Behandlungsoptionen besonders für fortgeschrittene Tumorstadien limitiert und die Prognosen in diesen Fällen mit Ansprechraten von 15 - 51 % und einem mittleren Gesamtüberleben von 5,3 - 10,2 Monaten dementsprechend schlecht sind (Dickson et al., 2004). Der dringende Bedarf nach therapeutischen Alternativen ist somit offensichtlich und zugrunde liegender Ansatzpunkt der vorliegenden Arbeit.

### **1.2.1 Anthrazykline**

In dieser Arbeit wurden für die Experimente Anthrazykline als chemotherapeutischer Kombinationspartner ausgewählt. Es handelt sich um isolierte Antibiotika aus *Streptomyces*-Arten, die als Zytostatika gegen unterschiedliche Karzinomtypen eingesetzt werden. Neben Doxo-, Ida-, und Daunorubicin zählt auch Epirubicin in diese Gruppe. Epirubicin wird, wie oben erklärt, in den Schemata zur chemotherapeutischen Behandlung des Magenkarzinoms sowohl perioperativ als auch in fortgeschrittenen Stadien verwendet (Cunningham et al., 2006; Moehler et al., 2011). Es inhibiert die DNA-Replikation, indem es an die Topoisomerase II $\alpha$  als Schlüsselenzym der Zellteilung bindet. Zudem interkalieren Anthrazykline in die DNA und können durch freie Radikale Doppelstrangbrüche erzeugen (Cortes-Funes et al., 2007). Eine durch HDACi hervorgerufene offene Chromatinstruktur bietet somit einen idealen Angriffspunkt für diese Therapeutika und führt darüber hinaus zu einer vermehrten Bindung der Topoisomerase II-Inhibitoren an die DNA (Munster et al., 2009).

## **1.3 Kombinationstherapie**

In zahlreichen *in vitro* Studien und in der Behandlung hämatologischer Systemerkrankungen wurde die monotherapeutische Wirkung von HDAC-Inhibitoren gezeigt. Dennoch konnten diese Ergebnisse in *in vivo* Studien mit Patienten, die an soliden Tumoren litten, nicht immer

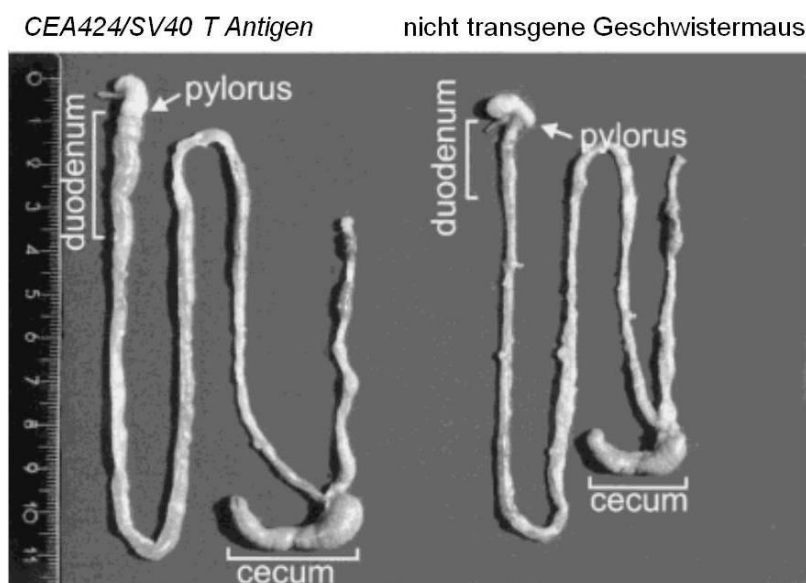
reproduziert werden. Angesichts der diversen molekularen Effekte auf das Tumorstadium und der guten Verträglichkeit mit beherrschbaren Nebenwirkungen ist das volle therapeutische Potential von HDAC-Inhibitoren wahrscheinlich nur in Kombination mit anderen Anti-Krebs-Medikamenten zu erreichen. Bisher konnten synergistische Wirkungen mit einer Vielzahl an Therapeutika gezeigt werden; dazu gehören zum Beispiel Todes-Rezeptor Liganden wie TRAIL, der Proteasom Inhibitor Bortezomib, der monoklonale HER2/neu Antikörper Trastuzumab oder der Tyrosinkinaseinhibitor Imatinib (Nakata et al., 2004; George et al., 2005). Die Erklärungsansätze hierfür beinhalten eine generelle Senkung der Apoptoseschwelle, simultane Aktivierung apoptotischer Signalwege und die Induktion oxidativer Schädigung (Pei et al., 2004). Für die vorliegende Arbeit von besonderer Bedeutung ist außerdem die Überlegung, ob die Reaktivierung von Tumorsuppressorgenen wie *CDKN1A* unter LBH589 Behandlung zu einer Sensibilisierung für nachfolgende Zytostatika führen kann.

Eine weitere Rationale für die Verwendung einer Kombinationstherapie bildet die Tatsache, dass die konventionelle, systemische Chemotherapie bei Patienten in fortgeschrittenen Tumorstadien eine geringe Effizienz zeigt. Um dies zu vermeiden, müssen im klinischen Alltag verschiedene Chemotherapeutika kombiniert werden, was die Toxizität für den einzelnen Patienten unverhältnismäßig erhöht und die Gefahr erheblicher Nebenwirkungen birgt. Eine Erklärung hierfür bietet das Modell der multiplen Chemotherapeutika Resistenzen (*multidrug resistance*). Das Nichtansprechen eines Tumors auf Chemotherapie wird im Krankheitsverlauf bei zahlreichen Krebserkrankungen beobachtet, obwohl die molekularen Grundlagen weitgehend unbekannt sind (Zhang et al., 2010). Zahlreiche Studien haben gezeigt, dass HDAC-Inhibitoren eine Sensibilisierung gegenüber konventionellen Chemotherapeutika bewirken können (Pauer et al., 2004; Munster et al., 2007; Rikiishi et al., 2007). Es ergibt sich die Frage, ob die multiplen Chemotherapeutika Resistenzen durch eine Vorbehandlung mit einem HDACi zu überwinden sind und inwieweit die Kombination aus epigenetischen Therapeutika und konventioneller Chemotherapie neue Behandlungsoptionen bieten und damit die Therapie des Magenkarzinoms weiter individualisieren kann.

#### 1.4 Mausmodell

Ein geeignetes präklinisches *in vivo* Modell ist für die Erforschung und Optimierung neuer Therapiemöglichkeiten unerlässlich. Zu diesem Zweck wurde von Thompson *et al.* ein Magentumor Mausmodell entwickelt, bei dem das onkogene SV40 T Antigen unter einem 424-bp CEA (*Carcinoembryonic antigen*) Promotor exprimiert wird (Thompson et al., 2000). CEA wird spezifisch im Gastrointestinaltrakt und in den Epithelzellen des Magens exprimiert. SV40 T Antigen ist ein sehr potentes Onkogen und wurde bereits häufig für die Erzeugung gewebsspezifischer Tumoren verwendet (Greenberg et al., 1995; Ewald et al., 1996). Die *CEA424/SV40 T Antigen (CEA/Tag)* transgene Maus entwickelt ein invasives, CEA positives

Adenokarzinom des Magens. Die Vorteile dieses Modells sind zum einen, dass die Entwicklung des Tumors vom Frühstadium an der des humanen Magenkarzinoms ähnelt und sich somit analog verfolgen lässt und zum anderen eine Tumorentstehung, die sich auf den Magen beschränkt. Dieses orthotope Wachstum bietet ein weitaus realistischeres Modell als die subkutan xenotransplantierten Humantumoren bei athymischen Mäusen. So variiert beispielsweise die Vaskularisation zwischen xenotransplantierten und endogenen Tumoren eklatant, was wiederum erheblichen Einfluss auf die Bioverfügbarkeit von Chemotherapeutika hat. Die Immunkompetenz kann zudem bei athymischen Mäusen erst gar nicht untersucht werden (Eades-Perner et al., 1994). Darüber hinaus zeigt der Tumor der *CEA/Tag* Mäuse eine 100 prozentige, geschlechtsunabhängige Penetranz, bildet die humane Situation auf Grund seiner authentischen Lokalisation entsprechend ab und ist therapeutischen Applikationen zugänglich. Die Entwicklung des hoch proliferativen Mukosatumors beginnt bei den Mäusen um den 19. Lebensstag in der Pylorus-Region. Im Alter von 100-130 Tagen kommt es durch die Blockade des Magenausgangs zum Tod der Tiere. Der Tumor hat zu dieser Zeit in das Duodenum penetriert und sich auf alle Wandschichten des Magens ausgedehnt (Abbildung 4).



**Abbildung 4:** Vergleich des Intestinums von einer *CEA/Tag* Maus und einer nicht transgenen Maus. Gezeigt sind Teile des Magens, inklusive Pylorus, Dünndarm, Zökum und Kolon. Auffällig ist die Schwellung im Pylorusbereich, die den Tumor markiert. Entnommen aus (Thompson et al., 2000).



## 2 Zielsetzung

In dieser Arbeit sollen initial die vorliegenden Kollektive aus Magentumorzelllinien, Patientenproben und Magengewebe von *CEA/Tag* Versuchstieren auf ihre HDAC2 Expression untersucht werden. Dafür wird sowohl die mRNA-Expression mittels quantitativer Realtime-PCR als auch die Proteinexpression mit Hilfe von Immunhistochemie und Western Blot bestimmt. Nachfolgend wird der therapeutische Effekt von LBH589 *in vitro* mit verschiedenen Proliferations- und Apoptose- sowie Enzymaktivitätsassays untersucht. Die Analyse des Einflusses auf HDAC-Degradation und Acetylierung auf Proteinebene soll zum Verständnis der genauen funktionellen Wirkmechanismen beitragen. Weiterhin wird auch die Wirkung von LBH589 auf humane, mononukleäre Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) analysiert, um die Wirkung von LBH589 in translationalen Studien zu bestätigen. Zu den bisher bekannten Wirkungsmechanismen von LBH589 gehören die Reaktivierung von Tumorsuppressorgenen und die Erhöhung der Proteindegradation. Beides wird mittels quantitativer Realtime-PCR untersucht. Wie bereits oben diskutiert, wird eine Überexpression von HDAC2 für eine ungünstige Prognose verantwortlich gemacht und steht zudem in Verdacht zu einer erhöhten Chemoresistenz beizutragen. Dies lässt im Umkehrschluss die Hypothese zu, dass eine reduzierte HDAC2 Expression zu einer verminderten Proliferation oder sogar zu einem verbesserten Ansprechen auf Chemotherapie führen kann. Zur Klärung dieser Fragestellung sollen siRNA transfizierte Zellen beitragen. Die rationalen Grundlagen für die Etablierung einer Kombinationstherapie mit Anthrazyklinen sind in Kapitel 5.6 dargelegt, wobei die Wirksamkeit dieses Therapieschemas *in vitro* unter Zuhilfenahme von MTT-Assays kontrolliert werden soll. Abschließend können die bis dahin gewonnenen Ergebnisse mittels *in vivo* Experimenten auf ihre Translationalität geprüft werden, wobei das *CEA/Tag* Mausmodell verwendet wird. Initial soll ein monotherapeutischer Vorversuch mit einer kleinen Kohorte durchgeführt und die LBH589 Wirkung anhand des Proliferationsmarkers Ki67 immunhistochemisch untersucht werden. Zuletzt erfolgt die Erprobung der Kombinationstherapie aus LBH589 und Epirubicin im Mausmodell. Hierbei werden erst die Tumormakroskopie und nachfolgend die mikroskopische Tumorausdehnung in den zu vergleichenden Gruppen (mit physiologischer Kochsalzlösung behandelte Kontroll-, Epirubicin-, und LBH589/Epirubicin-Kombinationsgruppe) betrachtet. Abschließend folgt eine immunhistochemische Untersuchung von Proliferations- und Apoptoseverhalten des Tumorgewebes.

### 3 Material

#### 3.1 Allgemeines

Material	Hersteller
Aqua Spüllösung	Braun, Melsungen, Deutschland
Biozym LE Agarose	Biozym, Oldendorf, Deutschland
Bromophenol-Blau	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Chloroform pro analysis	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Cristal Violet	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Doxorubicin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Epirubicin	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ethanol absolute pro analysis	Merck, Darmstadt, Deutschland
Ethidiumbromid, 10 mg / ml	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Ficoll-Paque PLUS	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Forene, 100 %	Abbott Laboratories, Illinois, USA
HCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
HEPES	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Instamed PBS Dulbecco	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Isopropanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
LBH589 (Panobinostat)	Novartis pharmaceuticals, Basel, Schweiz
Magermilchpulver	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Methanol	Merck, Darmstadt, Deutschland
Paraformaldehyd	Merck, Darmstadt, Deutschland
Pertex® Eindeckmedium	Medite, Burgdorf, Deutschland
Phenol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Rotiphorese® Gel 30	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Material	Hersteller
SDS ultra pure	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Temed	Roth, Karlsruhe, Deutschland
TRIS Ultra Qualität	Roth, Karlsruhe, Deutschland
TRIS-HCl	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Tween 20	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Wasserstoffperoxid 30 % pro analysis	Roth, Karlsruhe, Deutschland
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland

### 3.2 Western Blot

Material	Hersteller
Albumin Fraktion V	Roth, Karlsruhe, Deutschland
ECL Detection reagents	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
PageRuler™ Plus Prestained Protein Ladder	Fermentas GmbH, St. Leon-Rot, Deutschland

### 3.3 Zelllinien

Name	Herkunft
AGS SNU1 SNU5 KATOIII N87	American Type Culture Collection, MD
MKN45 MKN7	Japan Cell Bank
HeLa	Zur Verfügung gestellt von PD Dr. Jens Siveke

### 3.4 Zellkultur

Material	Hersteller
0.05 % Trypsin-EDTA	Life Technologies, Inc./ Invitrogen, CA, USA

Material	Hersteller
DMEM Medium	Life Technologies, Inc./ Invitrogen, CA, USA
Fetal Bovine Serum (FBS)	Life Technologies, Inc./ Invitrogen, CA, USA
FuGENE® 6 Transfection Reagent	Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland
Interferin	Polyplus-transfection SA, Illkirch, France
PBS Phosphate Buffered Saline pH 7.4	Life Technologies, Inc./ Invitrogen, CA, USA
Penicillin-Streptomycin Liquid	Life Technologies, Inc./ Invitrogen, CA, USA
RPMI 1640 Medium 1X	Life Technologies, Inc./ Invitrogen, CA, USA
Trypan Blue stain 0.4 %	Life Technologies, Inc./ Invitrogen, CA, USA

### 3.5 Enzyme

Name	Hersteller
2xGoTAQ Green Mastermix	Promega Corporation, Madison, USA
Hot Start Taq DNA - Polymerase	MBI Fermentas, St. Leon-Rot, Deutschland
Proteinase K, 10 mg/ml in ddH <sub>2</sub> O	Sigma-Aldrich, Steinheim , Deutschland
LightCycler FastStart DNA Master SYBR green kit	Roche Diagnostics, Penzberg, Deutschland

### 3.6 Antikörper

#### 3.6.1 Primäre Antikörper

Name	Verdünnung		Hersteller
Ac-Histone H4 (Lys12, sc-34266)	1:1000	5% Milch/PBS	Santa Cruz, CA, USA
HDAC2 (H-54, sc-7899)	1:1000	5% Milch/PBS	Santa Cruz, CA, USA
HDAC2 (3F3, sc-81599) für IHC	1:200		Santa Cruz, CA, USA
RLIM	1:1000	5% Milch/PBS	Zur Verfügung gestellt von Prof. Ingolf Bach
β-Actin (AC-15, sc-69879)	1:2000	5% Milch/PBS	Santa Cruz, CA, USA

### 3.6.2 Sekundäre Antikörper

Sekundäre Antikörper			
Anti- Rabbit IgG, Horseradish Peroxidase linked whole antibody (from donkey), #NA934V	1:5000	5% Milch/PBS (WB)	GE Healthcare
Anti-Mouse IgG, Horseradish Peroxidase linked whole antibody (from sheep), #NA931V	1:5000	5% Milch/PBS (WB)	GE Healthcare
EnVision+System-HRP Labelled Polymer Anti-mouse; #K4001	1:1000	1% BSA/PBS (IHC)	Dako, Dänemark
System-HRP Labelled Polymer Anti-rabbit; #K4003	1:1000	1% BSA/PBS (IHC)	Dako, Dänemark

### 3.7 Kits

Name	Hersteller
BCA™ Protein Assay Kit	Thermo Fisher Scientific, Inc., Surrey, UK
DAB Peroxidase Substrate Kit	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA
HDAC Activity Assay Kit	Cayman Chemicals Company, MI, USA
QIAshredder™	Quiagen, Hilden, Deutschland
RNase-Free Dnase Set	Quiagen, Hilden, Deutschland
Rneasy® Mini Kit	Quiagen, Hilden, Deutschland
Tissue Array ST 843	US Biomax, Rockville, USA
Vectastain® ABC kit peroxidase Rabbit IgG	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA
Vector® M.O.M.™ Immunodetection Kit	Vector Laboratories, Inc., Burlingame, USA
Verso™ cDNA Kit	Thermo Fisher Scientific, Inc., Surrey, UK

### 3.8 Primer

Gen	Primer forward 5'-3'	Primer reverse 5'-3'
<b>Humane Expressionsprimer</b>		
<i>HDAC2</i>	TGATATTGTGCTTGCCATCCTT	TTCAACACCATCACCATGATGA
<i>CDKN1A</i>	AGGCTGAAGGGTCCCCAG	CGGCGTTTGGAGTGGTAGAA
<i>RLIM</i>	TGGAAAGGGCAGAGTCACGGAGTGGA	TCGACCCTCTCGCCTGGCACCT
<i>RFPL4</i>	GCCCTGTGCGTCTCTGGGCACC	TCCTTGACACGCCCCACATCCCA
<i>B2M</i>	TGCTGTCTCCATGTTTGATGTATCT	TCTCTGCTCCCCACCTCTAAG
<b>Murine Expressionsprimer</b>		
<i>mHdac2</i>	TGGAGGACTACATCATGCCA	CTTCCTCAACACCATCACCA
<i>mCdkn1a</i>	GCCAGCAGAATAAAAGGTGCCACAGGC	GCGCATCGCAATCACGGCGCA
<i>mRlim</i>	TGCTGGGCACCCCAGGTGAAAGT	TCATCGGGGCTCTGTGGTGGTGGGA
<i>mRfpl4</i>	ACCAGCCGAGAAGAGGCACTGGC	GGGGCACAGTACACCGTCCCCTTCA
<i>mB2m</i>	ATGGAAGCCGAACATACTG	CAGTCTCAGTGGGGGTGAAT
<b>Genotypisierungsprimer</b>		
<i>CEA/Tag</i>	AATTCTGAAGGAAAGTCCTTGG	GGTCTTGAAAGGAGTGCCTG

### 3.9 Geräte

Gerät	Hersteller
Amersham™ ECL	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Axio Imager A.1 Lichtmikroskop	Carl Zeiss MicroImaging, Göttingen, Deutschland
Centrifuge 5415R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Centrifuge 5810R	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Dispergiergerät DIAX 900	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Duomax 1030 Orbitalschüttler	Heidolph Instrument, Schwabach, Deutschland
Emax precision microplate reader, Molecular Devices	McKinley Scientific, New Jersey, USA

Gerät	Hersteller
GelDoc™ XR Geldokumentationsstation	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Hyper processor SRX-101A	Amersham Biosciences Europe, Freiburg, Deutschland
Kryostat HM 560 Cryo-Star	Microm International, Walldorf, Deutschland
LightCycler® 480	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Mini-PROTEAN® 3 Cell	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
NanoDrop® Spectrophotometer ND-1000	PEQLAB Biotechnologie, Erlangen, Deutschland
PCR GeneAmp PCR System 9700	Applied Biosystems, Foster City, CA, USA
Precision microplate reader	Molecular Devices, Ismaning, Deutschland
Protran BA 83 Nitrocellulose	Whatman GmbH, Dassel, Deutschland
Sonoplus HD 2070	Bandelin electronic, Berlin, Deutschland
Superfrost® Plus Objektträger	Menzel, Braunschweig, Deutschland
Thermomixer compact	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Vortexer Reax 2000	Heidolph Instruments, Schwabach, Deutschland
Wide Mini-Sub Cell GT	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland
Wide Mini-Sub® Cell GT	Bio-Rad Laboratories, München, Deutschland

## 4 Methoden

### 4.1 Zellkultur

#### 4.1.1 Kultivierung von Zelllinien

Die Zelllinien AGS und HeLa wurden mit DMEM Medium und die Zelllinien MKN7, MKN45, SNU1, SNU5, KATOIII, N87 mit RPMI 1640 Medium bei 37 °C und 5 % CO<sub>2</sub> unter Zusatz von 10 % FCS kultiviert.

Das Passagieren der Zellen wurde bei einer Konfluenz von 80 - 90 % vorgenommen. Hierzu wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und anschließend fünf Minuten bei 37 °C mit 0,05 % Trypsin inkubiert. Im Folgenden konnte das Trypsin durch erneute Zugabe von Medium mit 10 % FCS inaktiviert und ein Teil der Zellsuspension in neues Medium überführt werden.

#### 4.1.2 Reagenzien

Für Zellkultur- und Tierexperimente wurde der Histon-Deacetylase-Inhibitor LBH589, Panobinostat in 5 % Dextroselösung verdünnt und eine 4.56 mM Stock-Lösung (2 mg/ml) hergestellt.

Doxorubicin und Epirubicin wurden für Experimente in Zellkultur als 10 mM Stock-Lösung (5.8 mg/ml Zellkultur-Medium) hergestellt. Für die Anwendung im Tierversuch wurde Epirubicin in DMSO (10 mg/ml) verdünnt.

### 4.2 Zelluläre Experimente

#### 4.2.1 MTT-Assay

Mit Hilfe des MTT-Assays kann die Zellwachstums- bzw. Zellüberlebensrate untersucht werden. Hierzu wurden die Zellen in einer Dichte von 5000 Zellen / Well oder 20.000 Zellen / Well auf eine 96-Well-Platte ausgesät. Am nächsten Tag wurde das Medium abgenommen und die Zellen entsprechend des jeweiligen Protokolls behandelt. Lebende Zellen wurden durch Zugabe des gelben Tetrazoliumsalz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) quantifiziert, welches durch die Aktivität der mitochondrialen Dehydrogenasen in vitalen Zellen zum blau-violetten Formazan metabolisiert wird. Es wurden pro 100 µl Medium / Well 10 µl MTT appliziert, die Reaktion nach 4 h durch Zugabe von 100 µl MTT-Lysepuffer abgestoppt und Zellen bei 37 °C über Nacht lysiert. Die Intensität der beobachteten Blaufärbung korreliert hierbei mit der Anzahl der vitalen Zellen und kann durch eine photometrische Messung der Absorption bei 570 nm (Referenz: 650 nm) im *Emax*



*precision microplate reader, Molecular Devices* gemessen werden. Es wurden mindestens Dreifachbestimmungen durchgeführt.

<b>MTT-Lysepuffer</b>	10 % (w / v) SDS
	0,01N HCL

#### **4.2.2 Colony Formation Assay**

Das Langzeitüberleben der Zellen wurde mit Hilfe des Colony Formation Assays untersucht. Hierzu wurden auf einer 6-Well-Platte 5000 Zellen / Well (Zählung mit Hilfe des *Zellcounter Countess automated cellcounter, Invitrogen*) in 2 ml Medium ausgesät und nach einer Adhäsionsphase behandelt. Für die LBH589-Monotherapie erhielten die AGS-Zellen 10 nM, 50 nM und 100 nM und die MKN45-Zellen 50 nM, 100 nM sowie 200 nM LBH589 für jeweils 24 h. Im Zuge der Kombinationstherapie wurde für AGS-Zellen eine LBH589-Konzentration von 50 nM und für MKN45-Zellen eine Konzentration von 100 nM während der ersten 12 h beibehalten. Im Anschluss erfolgte ein weiteres 12-stündiges Behandlungsintervall mit einer Doxo- bzw. Epirubicin-Konzentration von 0,1 µM. Nach diesem Intervall wurde ein Wechsel des Mediums vorgenommen und das Wachstum nach 10 Tagen durch Fixierung mit Methanol und anschließender Färbung mit 0.5 % Kristallviolett beendet. Größe und Anzahl der Kolonien wurde mit Hilfe der ImageJ Software berechnet.

<b>Kristallviolett</b>	20 % (v / v) Methanol
	0,5 % (v / v) Kristallviolett

#### **4.2.3 HDAC-Enzymaktivitätsassay**

Der HDAC-Enzymaktivitätsassay ist ein fluoreszenzbasiertes Verfahren zur Quantifizierung der HDAC-Aktivität und dient somit indirekt dem molekularen Wirkungsnachweis von LBH589. Den Ausgangspunkt bildet hierbei das HDAC-Substrat, das eine acetylierte Lysin-Seitenkette beinhaltet. Nach Inkubation mit nukleären Zellextrakten, welche HDAC Klasse I Enzyme besitzen, kommt es zur Deacetylierung der Lysinreste. In einer zweiten Reaktion werden die deacetylierten Substratmoleküle durch Hinzufügen der Entwicklerlösung freigesetzt und photometrisch sichtbar gemacht.

Es wurden nukleäre Extrakte von AGS- und MKN45-Zellen verwendet und mit unterschiedlichen Konzentrationen von LBH589 behandelt. Die Isolation der Kerne und Extraktion der nukleären Komponenten sowie die Erstellung des HDAC Assay Puffers erfolgten nach Protokoll des Herstellers. Die Proteinproben wurden zusammen mit dem Puffer in eine licht undurchlässige 96-Well-Platte pipettiert und die Reaktionen durch Zugabe des HDAC Substrates initiiert. Es folgten eine 30 minütige Inkubation bei 37 °C und im Anschluss das Hinzufügen der Entwicklerlösung. Nach 15 min Inkubation bei

Raumtemperatur konnte die Fluoreszenz abschließend mit einem Plattenphotometer (Exzitation 340 - 360 nm, Emission 440 - 465 nm) gemessen werden. Zusätzlich wurden parallel eine Negativ-Kontrolle mit dem HDAC-Inhibitor Trichostatin A sowie eine Positiv-Kontrolle unter Zugabe von human rekombinatem HDAC I durchgeführt. Die mathematische Auswertung geschah nach Angaben des Herstellers.

#### 4.2.4 *Transiente Transfektion von Zellen*

Die transiente Transfektion eukaryotischer Zellen mit *small interfering* RNA (siRNA) führt zu einer Verringerung der Expression spezifischer Zielgene. Durch RNA-Interferenz wird die mRNA des Zielgens abgebaut und es resultiert ein Gen-Knockdown, der es ermöglicht, Hinweise auf die physiologische Bedeutung des betreffenden Genes zu erhalten. Die Transfektion wurde unter Einsatz des Transfektionsreagenz Interferin, Polyplus-transfection nach Angaben des Herstellers durchgeführt und erfolgte 24 h nach dem Aussäen der Zellen bei einer Konfluenz von etwa 60 - 70 %. Dabei wurden für eine 35 mm Platte 10 ng siRNA / Well in 300 µl serumfreiem Medium für 10 min bei Raumtemperatur inkubiert. Für die Überexpression von HDAC2 wurden 2 µg DNA / Well (TopoHDAC2) eingesetzt und in 100 µl serumfreiem Medium für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Als Transfektionsreagenz erfolgte die Verwendung von FuGENE® 6 Transfection Reagent nach Angaben des Herstellers. Als Kontrolle wurde eine Transfektion mit pcDNA durchgeführt und die Transfektionseffizienz mit Hilfe einer Realtime-PCR überprüft.

### 4.3 Proteinanalyse

#### 4.3.1 *Proteinpräparation*

Als Vorbereitung einer Analyse des zellulären Proteingehalts wurden nach Behandlung gemäß der im Experiment erforderlichen Bedingungen Protein-Lysate hergestellt. Hierzu wurden die Zellen zu Beginn mit PBS gewaschen und durch Zugabe des Protein-Lyse-Puffers unter Eiskühlung lysiert. Die Membran- und DNA-Bestandteile wurden mittels einer Ultraschallbehandlung (*Sonicator Sonoplus*) der Lösung für 10 Sekunden bei 30 % Energie zerstört. Anschließend wurde das Zelllysat für 10 min bei 13 000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Im Überstand befindet sich die Gesamtproteinmenge der Zellen. Von allen Proben wurden 10 µl zur Proteinbestimmung entnommen, der verbleibende Teil wurde bis zur Verwendung für SDS-PAGE / Western Blotting bei - 20 °C aufbewahrt.

**SDS Lysepuffer**     50 mM Tris-HCl, pH 7.6  
                           2% (w / v) SDS

**hinzugefügt:**     1 mM Na<sub>3</sub>VO<sub>4</sub>  
                           1 mM DTT  
                           Protease inhibitor cocktail (*Roche Diagnostics, Penzberg*)

### 4.3.2 Proteinbestimmung

Für die Untersuchung der Proteinexpression mit Hilfe des Western Blots ist eine einheitliche Proteinkonzentration entscheidend, insbesondere, wenn hierbei die Expressionslevel bestimmter Proteine verglichen werden sollen. Die Proteinbestimmung erfolgte unter Verwendung des *BCA<sup>TM</sup> Protein Assay Kit (Thermo Fisher Scientific)*. Hierzu wurden 10 µl der zu bestimmenden Proteinlösung in eine 96-Well-Platte vorgelegt. Nach Zugabe von 200 µl der BCA Protein Assay Reagenzien A und B, die im Verhältnis 50:1 frisch vermischt wurden, folgte eine 30 minütige Inkubation bei 37 °C unter Lichtausschluss. Die Messung der Absorption im Plattenphotometer (*Emax precision microplate reader, Molecular Devices*) erfolgte bei 570 nm. Die Standardreihe wurde mit Hilfe acht verschiedener *bovine serum albumin (BSA)* Konzentrationen im Bereich von 25-2000 g / ml nach Angaben des Herstellers ermittelt, wobei jeweils aus drei Messungen der Mittelwert gebildet wurde.

### 4.3.3 Western Blot

#### 4.3.3.1 Aufbereitung der Proben

Die nach 4.3.1. aufbereiteten Zellhomogenate wurden in *5X SDS loading buffer* 7 min bei 99 °C denaturiert.

<b>5X SDS Ladepuffer</b>	62.5 mM Tris-base, pH > 10
	10 % (w / v) SDS
	5 % (v / v) β-Mercaptoethanol
	50 % (v / v) Glycerol
	Bromphenolblau

#### 4.3.3.2 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese

Für die Proteinanalytik wurde eine denaturierende Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-PAGE) durchgeführt. Diese Methode ermöglicht eine Auftrennung der Proteine entsprechend ihres Molekulargewichtes und bildet die Grundlage für das spätere Blotting. Die Separierung der Proteine erfolgte in einem 1 mm dicken Polyacrylamid-Gel bestehend aus einem 4 %-igen Sammel- und einem 15 %-igen Trenngel (Tab.1) in einer Standard-Elektrophoreseapparatur (*Mini-Protean 3 Cell, Biorad Laboratories*) gefüllt mit Laufpuffer bei einer konstanten Stromstärke von 25 mA. In Abhängigkeit von der Sensitivität der verwendeten Antikörper wurden Proteinmengen zwischen 10 µg und 20 µg aufgetragen. Als Molekulargewichtsstandard wurde hierbei *PageRuler Plus, Prestained Protein Ladder* von *Fermentas* eingesetzt.

<b>Laufpuffer</b>	192 mM Glycine
	25 mM TrisBase
	0.1 % (w / v) SDS

#### 4.3.3.3 *Transfer der Proteine auf die Membran*

Nach der SDS-PAGE folgte ein 60 minütiger Transfer der elektrophoretisch aufgetrennten Proteine auf eine *Protran-Nitrocellulose-Membran*. Hierbei wurde das *Mini-Protean Tetra System* verwendet und mit Transferpuffer gefüllt. Das Gel wurde zusammen mit der Membran zwischen Schwämmen und mehreren Lagen Filterpapier eingebettet und mit einer Kühleinheit im Tank platziert. Das Blotting erfolgte für 1 h bei einer konstanten Spannung von 100 V.

<b>Transferpuffer</b>	192 mM Glycin
	25 mM TrisBase
	20 % (v / v) MeOH

#### 4.3.3.4 *Detektion der Proteine*

Nach dem Western-Blotting wurden die unspezifischen Bindungsstellen der Membran durch eine einstündige Inkubation mit 5 % Trockenmilch / PBS bei Raumtemperatur blockiert. Daran schloss sich die Immunodetektion der Proteine an: Über Nacht erfolgte die Inkubation mit dem jeweiligen Antikörper (siehe Abschnitt 3.6.1) bei 4 °C, anschließend wurde der Blot 3 x 20 min mit T-PBS (0.1 % (v / v) Tween 20 in PBS) gewaschen und 2 h mit einem Peroxidase-gekoppelten sekundären Antikörper (siehe Abschnitt 3.6.2) inkubiert. Sowohl primärer als auch sekundärer Antikörper wurden in 5 % Trockenmilch / PBS verdünnt. Die Detektion der Proteine erfolgte durch Chemilumineszenz. Dazu wurden die Membranen eine Minute lang in ECL, Amersham inkubiert und im Folgenden unverzüglich in einer Filmkassette platziert. Die Banden wurden durch Belichtung eines Films (*Amersham Hyperfilm ECL*) und anschließender Entwicklung im *Hyperprocessor (SRX-101A, Amersham Biosciences)* sichtbar gemacht.

15 % Sammelgel		4 % Trenngel
1,89 ml	H <sub>2</sub> O	1.53 ml
4,2 ml	Acrylamid 30% / 0,8%	333 µl
2,1 ml	Tris-HCl 1,5 M, pH 8,8	
	Tris-HCl 0,5 M, pH 6,8	625 µl
83 µl	SDS 10 %	25 µl
42 µl	APS 10 %	12,5 µl
2,8 µl	Temed	2,5 µl
8,3 ml	Totales Volumen	2,5 ml

**Tabelle 1:** Zusammensetzung Sammel- und Trenngel der SDS-Polyacrylamid-Gel-elektrophorese

## 4.4 Nukleinsäure basierte Verfahren

### 4.4.1 RNA-Isolierung

Zur RNA-Isolierung wurde das *RNeasy MiniKit* nach Angaben des Herstellers verwendet. Hierbei wurden die Zellen mit Hilfe von RLT-Puffer und zugesetztem RNase-Inhibitor  $\beta$ -Mercaptoethanol (im Verhältnis 10:1) lysiert. Im Falle einer Isolierung aus kryokonserviertem Gewebe erfolgte die Verwendung des Dispergiergeräts DIAX900 (*Heidolph Instruments*) zur Homogenisierung. Im Folgenden wurde das Gewebe- oder Zelllysate in ein QIAshredder tube (*QIAshredder, Qiagen*) gegeben und zentrifugiert. Nach der Präzipitation der RNA mittels 70 %-igen Ethanol wurde die RNA zur Aufreinigung auf eine Siliziumdioxid Säule, *RNeasy Spin column*, überführt. Freie DNA wurde durch die Zugabe des Enzyms DNase I (*RNase-Free DNase Set*) verdaut; nach diversen Waschschrritten kann die RNA in RNase freiem Wasser von der Säule eluiert werden.

### 4.4.2 Quantitative Nukleinsäureanalyse

Die Konzentrationsbestimmung von Nukleinsäuren erfolgte durch Messung der optischen Dichte (OD) mithilfe des *NanoDrop XY Spektrophotometers*. Dabei wurde die Absorption der Lösung bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen und daraus die Nukleinsäurekonzentration abgeleitet. Ein Vorteil des NanoDrop Spektrophotometer ist das geringe Probenvolumen von nur 1 µl, das direkt auf die Messoberfläche pipettiert wird. Durch die Oberflächenspannung der Probe wird eine Flüssigkeitssäule zwischen den Enden der optischen Fasern der Messoberfläche und des Schwingarms aufgebaut, die den Messpfad

etabliert. Da gleichzeitig bei 280 nm gemessen wird, kann dann aus dem 260/280 Verhältnis die Reinheit der RNA bzw. DNA bestimmt werden.

#### 4.4.3 cDNA-Synthese

Der erste Schritt zur Analyse des Expressionsniveaus ist die Umschreibung von isolierter mRNA in cDNA. Dieser Prozess besteht aus drei Schritten: Dem *Annealing* randomisierter Primer an die mRNA, der Synthese eines komplementären cDNA Strangs durch die Reverse Transkriptase unter Verwendung von dNTPs sowie der endgültigen Degradation der mRNA durch die RNase H Aktivität der Reversen Transkriptase.

Für die Herstellung der cDNA wurde *das Thermo Scientific Verso cDNA Kit* verwendet. Es wurden 2 µg DNase-verdaute, aufgereinigte total-RNA eingesetzt, 4 µl 5X cDNA Synthesis Buffer, 1 µl Anchored Oligo-dT (500 ng / µl), 1 µl Random Hexamer (400 ng / µl), 2 µl dNTP Mix (jeweils 5 mM), 1 µl RT Enhancer und 1 µl Verso Enzyme Mix hinzugefügt und die Lösung mit ddH<sub>2</sub>O auf 20 ng / µl aufgefüllt. Es folgten eine einstündige Synthesephase bei 42 °C und ein 2-minütiger Erhitzungsschritt auf 99 °C, der zur Inaktivierung des Enzyms diente.

#### 4.4.4 Quantitative realtime PCR (Q-PCR)

Für die Quantifizierung der Expression spezifischer Gene wurde die quantitative realtime PCR verwendet. Dabei wurden für die Reaktion 40 ng cDNA, *SYBR Green* sowie 1 µM Primer eingesetzt und mit H<sub>2</sub>O PCR grade aufgefüllt. Die RNA wurde mit Hilfe des *RNeasy Mini Kit* aus Geweben und Zellen wie in 4.4.1 beschrieben isoliert und die reverse Transkription anschließend mittels *Verso cDNA Kit* nach 4.4.3 vorgenommen. Für die Amplifikation der cDNA wurde *das LightCycler FastStart DNA Master SYBR green* mit den in Tabelle 3.8 aufgeführten Primern genutzt (Burgermeister et al., 2007). Die RNA des gesunden Kontrollgewebes aus humanem Magen wurde von *Stratagene, CA, USA* bezogen. Das PCR-Programm bestand aus initialer Denaturierung von 2 min bei 94 °C. Es folgten 40 Zyklen von je 15 sec Denaturierung bei 95 °C, 15 sec Annealing bei 55 °C und 20 sec Extension bei 68 °C. Die Spezifität der Primer wurde durch eine Schmelzkurvenanalyse am Ende der Reaktion bestimmt. Die Quantifizierung der Reaktionskurven erfolgte mit dem *LightCycler 480* und der dazugehörigen Software (*LightCycler 480 Software release 1.5.0.*).

Bei der quantitativen realtime PCR wird die Quantifizierung der amplifizierten cDNA mit Hilfe von Fluoreszenzmessungen vorgenommen, die während eines PCR-Zyklus erfasst werden. Hierbei interkaliert ein Fluoreszenzfarbstoff (*SYBR Green*) in die DNA, wodurch die Fluoreszenz dieser Farbstoffe proportional zur Menge des PCR-Produktes ansteigt. Zur Quantifizierung der Produktmenge wurde in der exponentiellen Phase der Amplifikation immer der gleiche Schwellenwert gesetzt. Somit wurden die Ct-Werte (*Threshold-Cycle*)

unterschiedlicher Reaktionen vergleichbar. Die PCR-Reaktionen wurden in Doubletten durchgeführt und aus den Ct-Werten der Mittelwert abgeleitet. Dabei wurden die Ergebnisse der Kandidatengene auf das Haushaltsgen beta-2-microglobulin (*B2M*) ( $\Delta Ct = Ct\text{-Gen} - Ct\text{-B2M}$ ) normiert und anschließend der  $\Delta\Delta Ct$ -Wert bestimmt. Die Berechnungen wurden nach (Eichenmuller et al., 2009) durchgeführt.

## 4.5 Genotypisierung

### 4.5.1 Phenol-Chloroform-Extraktion

Die Isolation der DNA für die Genotypisierung der Mäuse erfolgte mittels Phenol-Chloroform-Extraktion. Hierzu wurden die circa 2 mm großen Gewebestücke (Mausschwanzspitze) über Nacht in 0,5 - 1 ml STE-Puffer mit 50 -I Proteinase K (10 mg/ml), *Sigma-Aldrich* bei 55 °C verdaut. Es folgte die Zugabe von 1 Vol. Phenol, eine 5-minütige Mischung per Hand und anschließend ein Zentrifugationsschritt von 10 min bei 3.000 rpm und 4 °C. Der Überstand wurde behutsam abgenommen und in ein neues Röhrchen überführt, 1 Vol. Chloroform zugegeben, abermals 5 min per Hand gemischt und der vorherige Zentrifugationsschritt unter gleichen Bedingungen wiederholt. Der Überstand wurde abgenommen, die enthaltene DNA mit 2,5 Vol. 100 % Ethanol für 90 min bei -80 °C präzipitiert und mit 70 % Ethanol gewaschen. Nach 10 min Zentrifugation bei 13.000 rpm wurde die DNA luftgetrocknet und abschließend in 50 - 100  $\mu$ l ddH<sub>2</sub>O gelöst.

<b>STE-Puffer</b>	20 mM Tris, pH 8,0
	0,1 M NaCl
	1 mM EDTA, pH 8,0
	1 % (w / v) SDS

### 4.5.2 PCR

Als Ausgangsmaterial wurden 40 ng genomische DNA verwendet. Der 20  $\mu$ l Reaktionsansatz bestand zusätzlich aus 1  $\mu$ M CEA-Primer (3.8) und *2xGoTAQ Green Mastermix*, *Promega*. Für die Reaktion wurde das *GeneAmp PCR System 9700* als Thermocycler verwendet. Das PCR-Programm bestand aus: einer primären 5-minütigen Denaturierung bei 94 °C, 40 PCR-Zyklen (30 sec bei 94 °C, 1 min bei 55 °C sowie 2 min bei 72 °C) und einer abschließenden Extention (7 min bei 72 °C). Bei transgenen CEA/Tag Tieren konnte eine 424 bp große Bande detektiert werden, Wildtyp-Mäuse waren dementsprechend negativ.

### 4.5.3 DNA-Elektrophorese

Zur Herstellung eines 1 %-Gels wurde die entsprechende Menge Agarose in TAE Puffer gegeben, in der Mikrowelle aufgekocht unter Zugabe von 0.25  $\mu$ g/ml Ethidiumbromid und der

Reaktionsansatz auf das Gel aufgetragen. Als Standard diente eine *10 kb Fermentas DNA-ladder*. Die Auftrennung der DNA wurde mit Hilfe einer Elektrophoreseapparatur (*Wide Mini-Sub® Cell GT, Bio-Rad Laboratories*) in TAE Puffer bei einer konstanten Spannung von 75 V vorgenommen. Zur Visualisierung der DNA-Banden wurde das Gel in einer Geldokumentationsstation mit integrierter Kamera (*GelDoc™ XR, Bio-Rad Laboratories*) unter UV-Licht betrachtet und anschließend fotografisch dokumentiert.

<b>TAE Puffer (pH 8.3)</b>	40 mM TrisBase
	1 mM EDTA, pH 8.0
	20 mM Essigsäure

#### 4.6 Humane Tumorproben

Tumorproben von Magenkarzinompatienten und korrespondierendes Normalgewebe wurden im Rahmen von Operationen oder bei endoskopischen Untersuchungen gewonnen. Die Analyse wurde entsprechend der ethischen Richtlinien in Abstimmung mit der Ethikkommission der Technischen Universität München durchgeführt.

#### 4.7 Tierversuche

Die Tierexperimente wurden mit transgenen CEA424/SV40 T-antigen (*CEA/Tag*) Mäusen, beschrieben in (Eades-Perner et al., 1994; Thompson et al., 2000), durchgeführt und auf C57BL/6 Wildtyp-Mäuse zurück gekreuzt. Als Vorversuch wurde den sechs Wochen alten Tieren eine 14-tägige LBH589 Monotherapie mit einer Konzentration 20 mg/kg/Injektion als intraperitoneale Injektion verabreicht. Das LBH wurde dafür in 5 % Dextroselösung gelöst. Die Applikation wurde über 14 Tage nach einem 5-days-on, 2-days-off Schema vorgenommen und die Tiere zwischen dem 75. und 81. Tag getötet. Für die Kombinationsbehandlung wurde den Tieren (n = 5) LBH589 ebenfalls für 14 Tage in der oben genannten Darreichungsform injiziert. Anschließend erhielten die *CEA/Tag* Mäuse dreimal 10 mg/ml Epirubicin in einem Zeitraum von zehn Tagen gelöst in DMSO, was einer Menge von 3 mg/kg / Injektion in 0,9 % NaCl entspricht. Schließlich wurde ein zusätzlicher Therapiezyklus mit einer 7-tägigen LBH589 und einer zweimaligen Epirubicin Behandlung während der letzten 7 Tage angeschlossen (verabreichte Konzentrationen, siehe oben). Eine vergleichbare Epirubicin Monotherapie (n = 6) wurde ebenso realisiert wie eine Kontrollgruppe, in der die Tiere (n = 5) 200 µl physiologische Kochsalzlösung als i.p. Injektion erhielten. Das Töten erfolgte nach 78 bis 83 Tagen unter vorheriger Betäubung mit 100 % *Forene* durch Genickbruch. Nach der Entnahme der Organe wurden diese unverzüglich in flüssigem Stickstoff kryokonserviert. Alle Versuche wurden gemäß den



ethischen Richtlinien der Technischen Universität München durchgeführt und sind durch die Regierung von Oberbayern genehmigt.

#### 4.7.1 Kryokonservierung / Kryoschnitte

Zur Kryokonservierung wurden die Gewebe sofort nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff konserviert und ohne weitere Fixierung bei -80 °C gelagert.

Das Anfertigen der Kryoschnitte erfolgte mit einer Dicke von 5 µm pro Schnitt unter Verwendung des *Kryostat HM 560 Cryo-Star*. Anschließend wurden die Objektträger bei -20 °C gelagert.

Die Proteinlysate aus Gewebe für die Verwendung im Western Blot wurde unter Zugabe von 200 µl Protein Lyse-Puffer hergestellt. Mit Hilfe des *Dispergiergeräts DIAX900* wurde das Gewebe homogenisiert, auf Eis inkubiert und für 10 min bei 10.000 rpm und 4 °C zentrifugiert. Abschließend konnte die Bestimmung der Proteinkonzentration vorgenommen werden, siehe 4.3.2.

<b>Protein Lyse-Puffer (pH 7.4)</b>	20 mM Hepes
	1 mM EDTA
	50 mM β-Glycerophosphat
	10 % Glycerol
	1 % Triton X-100
	ddH <sub>2</sub> O
	1 mM DTT
	1x Protease Inhibitor Cocktail ( <i>Roche, Diagnostics, Penzberg</i> )

## 4.8 Immunhistochemie

Die Immunhistochemie erlaubt die Visualisierung von Proteinen in Gewebe. Dabei bedient man sich spezifischer Antikörper, die durch Bindung an das charakteristische Epitop eine Markierung bewirken. Durch ein an den sekundären Antikörper gekoppeltes Detektionssystem, welches auf der Aktivität von Peroxidasen beruht, können Lokalisation und Vorhandensein der Proteine lichtmikroskopisch sichtbar gemacht und quantifiziert werden.

Die Färbung der Kryoschnitte erfolgte mit Hilfe des *Vectastain® ABC Kits* sowie des *DAB Peroxidase Substrate Kits*. Nach dem Auftauen der Kryoschnitte wurden diese mit 4 % PFA für 10 min bei Raumtemperatur (RT) fixiert und anschließend für 3 x 2 min in PBS gewaschen. Um die Aktivität endogener Peroxidase zu unterdrücken, wurden die Schnitte für 20 min in 3 % (v / v) H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> verdünnt in PBS, inkubiert. Es folgte eine einstündige Blockierung der unspezifischen Bindungsstellen mit 5 % (v / v) goat serum in 1 % (w / v) BSA / PBS in einer Feuchtkammer bei RT. Nach Entfernung der Blockierungslösung wurden die Schnitte über Nacht bei 4 °C mit dem primären Antikörper, verdünnt in 5 % (v / v) goat serum in 1 %

(w / v) BSA / PBS gemäß Angaben in 3.6.1, in der Feuchtkammer inkubiert. Am nächsten Tag wurden die Schnitte 3 x 2 min in PBS gewaschen. Anschließend folgte eine Inkubation mit dem sekundären Antikörper (verdünnt 1:1000 in 1 % (w / v) BSA / PBS) 1 h bei Raumtemperatur. Den ersten Schritt der enzymatischen Detektion bildete die Inkubation mit der nach Angaben des Herstellers präparierten ABC-Mischung 30 min bei Raumtemperatur. Im zweiten Schritt wurde die DAB-Lösung, welche 3`3`-Diaminobenzidin als Substrat für die Peroxidase enthält, auf die Kryoschnitte aufgebracht und eine Braunfärbung abgewartet. Das Abstoppen der Reaktion erfolgte durch Waschen mit dH<sub>2</sub>O. Die verstrichene Zeit wurde notiert, um eine identische Reaktionszeit für alle Schnitte zu gewährleisten. Es erfolgte eine Gegenfärbung mit Haematoxilin. Im Anschluss wurden die Schnitte in einer aufsteigenden Alkoholreihe (70 % EtOH, 96 % EtOH, 100 % EtOH, HistoClear) dehydriert und mit Hilfe von *PERTEX Medium* eingedeckt. Nach dem Trocknen konnten die Objektträger unter dem Mikroskop mittels der *AxioVision Software* (beides Carl Zeiss GmbH) untersucht werden.

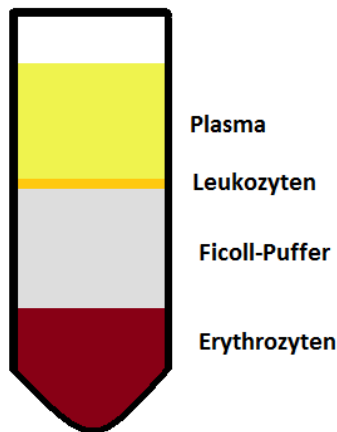
Für die immunhistochemische Färbung mit dem Hdac2-Antikörper im murinen Gewebe musste das *Vector® M.O.M.™ Immunodetection Kit* verwendet werden. Das Hauptproblem einer immunhistochemischen Detektion, bei der ein primärer Maus-Antikörper verwendet wird, ist, dass der sekundäre anti-Maus-Antikörper nicht imstande ist, zwischen primärem Antikörper und endogenen Immunoglobulinen des Gewebes zu unterscheiden. Als Konsequenz resultiert eine fehlende Spezifität der Immundetektion, die sich in einer starken Hintergrundfärbung äußert und durch die Verwendung des *Vector® M.O.M.™ Immunodetection Kits* umgangen werden kann.

Hierzu wurden die Kryoschnitte wie oben beschrieben fixiert und der endogene Peroxidase-Block durchgeführt. Die Blockierung unspezifischer Antikörperbindungsstellen erfolgte durch eine einstündige Inkubation mit *M.O.M.™ Maus Ig-Blocking* bei RT. Nach wiederholtem Waschen in PBS folgte eine 5-minütige Inkubation mit *M.O.M.™ - Diluent Lösung* bei RT. Der primäre Hdac2-Antikörper wurde entsprechend (siehe 3.6.1) in *M.O.M.™-Diluent Lösung* verdünnt und über Nacht bei 4 °C in einer Feuchtkammer auf den Schnitten belassen. Nach dem Waschen mit PBS folgte eine einstündige Inkubation mit dem sekundären *M.O.M.™ Biotinylated Anti-Mouse IgG* Antikörper in *Diluent Reagent* bei RT. Die enzymatische Detektion mit ABC- und DAB-Reagenz sowie Gegenfärbung mit Haematoxilin wurde wie oben beschrieben vorgenommen (Ono et al., 2002; Burgermeister et al., 2007).

## 4.9 Ficoll-Paque PLUS

Die Isolierung von mononukleären Zellen aus peripherem Blut (PBMCs) erfolgte durch Ficoll-Dichtegradientenzentrifugation (*Ficoll-Paque Plus*) aus EDTA-Blut von gesunden Probanden. Dazu wurde das Blut im Verhältnis 1:1 mit einer isotonisch balancierten Lösung verdünnt, behutsam auf den Ficoll-Puffer überschichtet und die Lösung zentrifugiert (400 x g und 29 °C 30 Minuten, ohne Bremse). Ficoll ist ein ungeladenes Polymer aus Saccharose und

Epichlorhydrin, dessen Dichte eine Separierung des Blutes ermöglicht, wobei sich die PBMCs auf Grund ihrer geringeren Dichte in der Interphase akkumulieren. Mit einer Pasteur-Pipette wurden die Zellen abgenommen und in zwei weiteren Waschschrinen von Thrombozyten und Plasma getrennt. Abschließend konnten sie in *RPMI 1640 Medium 1X* aufgenommen und für circa 14 Tage unter den in 3.4 genannten Bedingungen kultiviert werden.



**Abbildung 5:** Darstellung des Funktionsprinzips des *Ficoll-Paque Plus*.

#### 4.10 Statistische Analysen

Die Ergebnisse sind jeweils als Mittelwert oder Median mit den zugehörigen Standardabweichungen ( $\pm$  S.D.) beziehungsweise Standardfehlern ( $\pm$  S.E.) angegeben. Die  $p$ -Werte (\*  $p \leq 0.05$ ) wurden per t-Test oder ANOVA-Test ermittelt. Die Analyse der Daten erfolgte mit *GraphPad Prism* Software oder *Excel*.

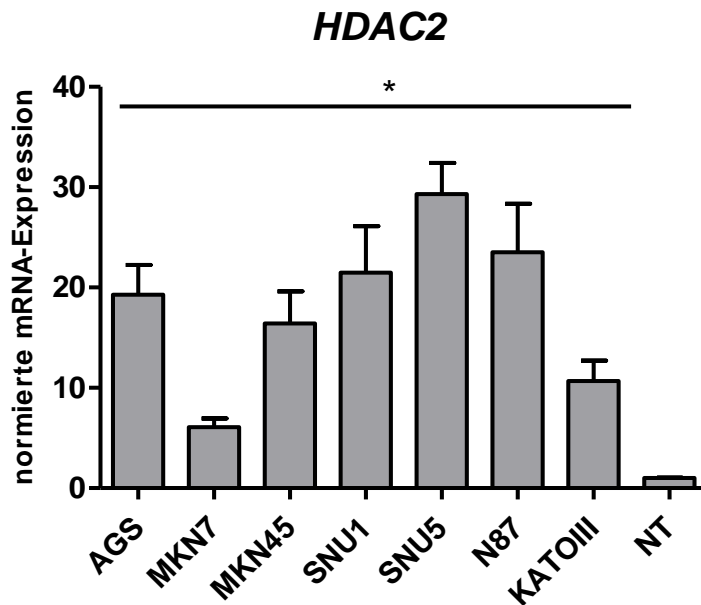
## 5 Ergebnisse

### 5.1 Expression von HDAC2

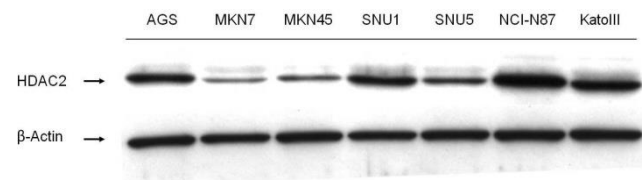
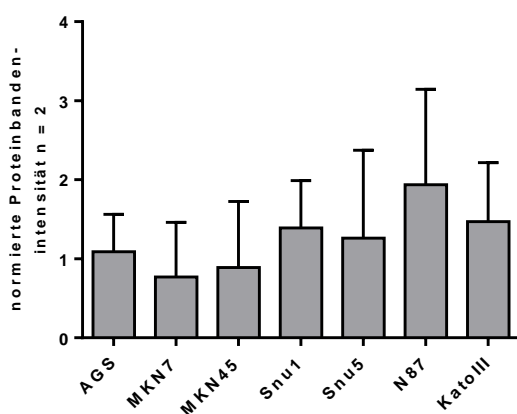
Wie in der Einleitung beschrieben, ist die erhöhte Expression von Klasse I HDACs im humanen Magenkarzinom mit einer schlechten Prognose assoziiert und kann somit einen unabhängigen prognostischen Marker darstellen (Weichert et al., 2008). Zu Beginn wurde in den Experimenten daher untersucht, ob in den uns vorliegenden humanen Magenzelllinien, den Patientenproben sowie im *CEA/Tag* Mausmodell eine Überexpression von HDAC2 auf RNA- und Proteinebene vorliegt und damit die Rationale für eine Therapie mit HDAC-Inhibitoren wie LBH598 gegeben ist.

#### 5.1.1 Zelllinien

Für die Analyse der mRNA Expression von *HDAC2* in humanen Magentumorzelllinien wurden sieben unterschiedliche Zelllinien (AGS, MKN7, MKN45, SNU1, SNU5, N87, KATOIII) untersucht. In der RT-PCR zeigt sich eine signifikante Erhöhung der *HDAC2* mRNA Expression in allen Zelllinien verglichen mit gesundem Normalgewebe des Magens ( $6.08 \pm 0.86$  fache Erhöhung für MKN7 bis zu  $29.32 \pm 3.11$  fach für SNU1) (Abbildung 6). Für die Analyse wurde die relative Expression von *HDAC2* im Vergleich zum Haushaltsgen *B2M* berechnet und zu gesundem Normalgewebe normalisiert. Auf Proteinebene erfolgte der Nachweis der HDAC2 Expression mit Hilfe des Western Blots (Abbildung 7). Nur bei MKN7 liegt sowohl eine geringe HDAC2 RNA Expression als auch Proteinkonzentration vor, bei den anderen Zelllinien ist beim Vergleich der RNA- und Proteinexpressionslevel keine direkte Korrelation ersichtlich. Dies kann auf eine Expressionskontrolle auf Proteinebene hindeuten. Damit ist gezeigt, dass in den uns vorliegenden Magentumorzelllinien sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene eine Überexpression von HDAC2 besteht.



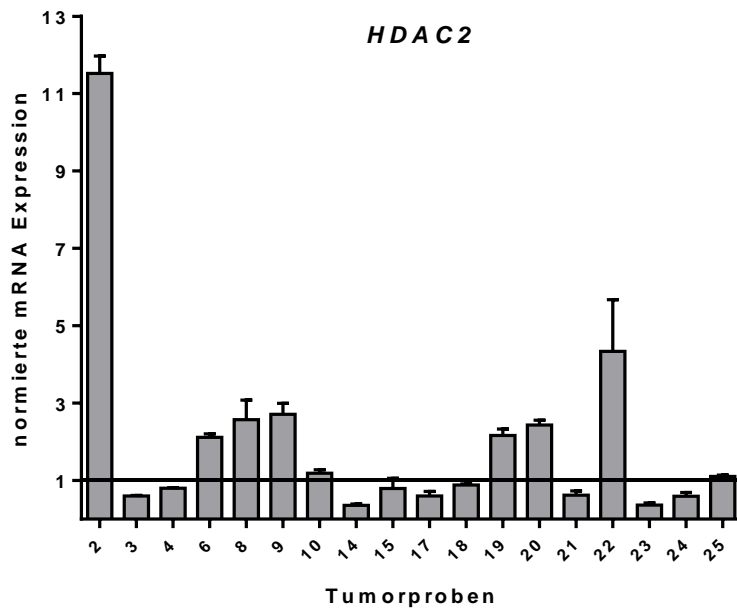
**Abbildung 6:** RT-PCR der sieben humanen Magentumorzelllinien (AGS, MKN7, MKN45, SNU1, SNU5, N87, KATOIII) normiert auf ein Haushaltsgen. Im Vergleich zu gesundem Normalgewebe (normal tissue = NT) ist eine signifikante Erhöhung der HDAC2 mRNA Konzentration  $\pm$ S.E. ( $n = 3$ ) zu erkennen. \*  $p < 0.05$ .



**Abbildung 7:** Auf Proteinebene ist eine HDAC2 Expression in allen sieben Zelllinien nachweisbar;  $\beta$ -Actin diente als Ladekontrolle. Links wird die Intensität der Proteinbanden mittels ImageJ visualisiert,  $\pm$  S.E.,  $n = 2$ .

### 5.1.2 Humane Tumorproben

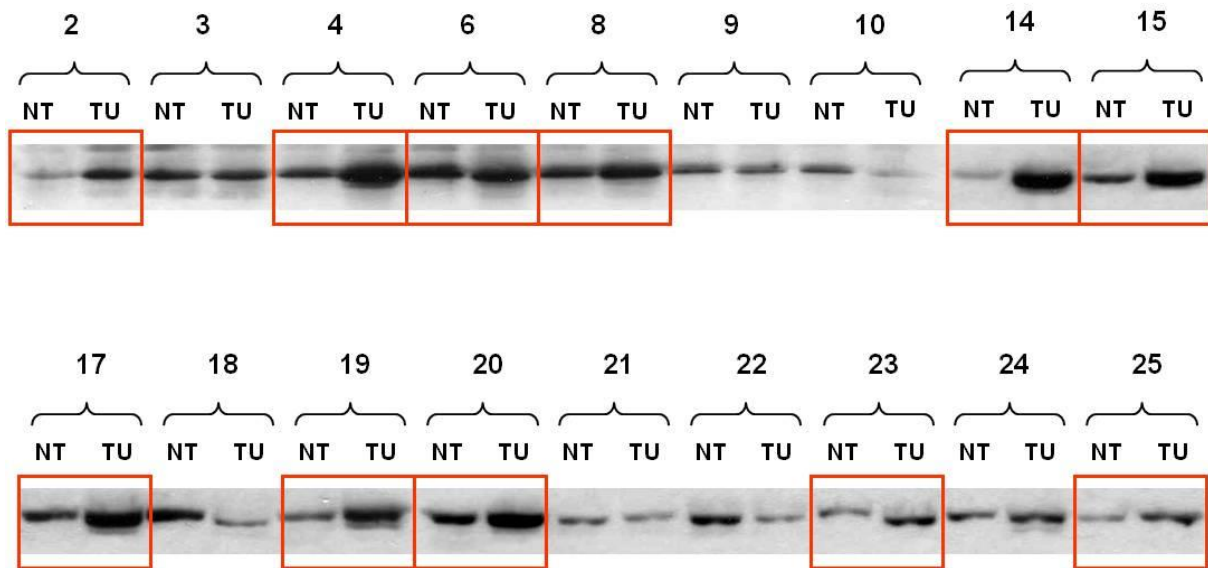
Um die Analyse zu erweitern, wurden im Folgenden humane Patientenproben des Magenkarzinoms (TU) und jeweils korrespondierendes gesundes Normalgewebe (NT) ( $n = 19$ ) miteinander verglichen. Auch hier zeigte sich auf RNA Ebene bereits eine Hochregulation von HDAC2 in 8 von 18 (44 %) Tumorproben (Abbildung 8).



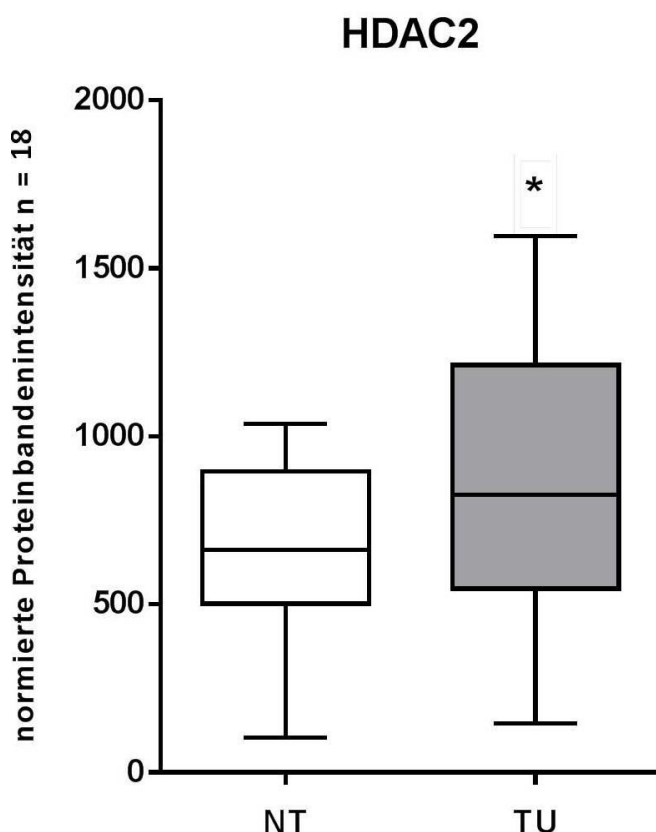
**Abbildung 8:** RT-PCR zur Darstellung der HDAC2 Expression in humanem Tumor- und Normalgewebe. Die Linie bei 1.0 definiert das Normalgewebe. Werte normiert auf ein Haushaltsgen  $\pm$  S.E. ( $n = 2$ ).

Diese Beobachtung konnte auch im Western Blot bestätigt werden (Abbildung 9). Hierbei ergibt sich eine Hochregulation von HDAC2 in 11 von 18 (= 61 %) Tumorproben im Vergleich zu den Normalgeweben. Zur besseren Visualisierung wurde die Intensität der Proteinbanden von TU und NT berechnet. Im Vergleich zum Normalgewebe kann im Tumorgewebe eine signifikant erhöhte Expression von HDAC2 detektiert werden (Abbildung 10).

Zusammenfassend lässt sich also festhalten, dass in den humanen Proben sowohl auf RNA- als auch auf Proteinebene eine erhöhte HDAC2 Expression in Tumoren nachgewiesen werden konnte.



**Abbildung 9:** Western Blot zur Veranschaulichung der HDAC2 Expression. Es werden jeweils Tumor- (TU) und Normalgewebe (NT) der Patientenproben verglichen.

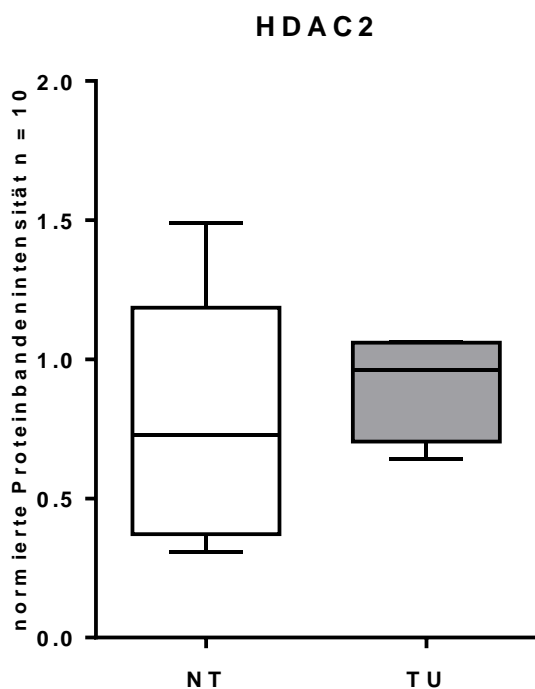
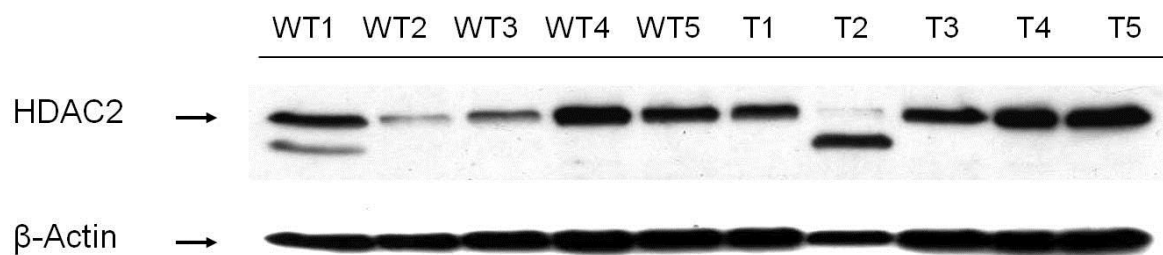


**Abbildung 10:** Die errechnete Intensität der Proteinbanden wurde jeweils auf die Proteinkonzentration normiert  $\pm$  S.E. ( $n = 18$ ) und weist eine signifikant höhere Proteinexpression im humanen Tumorgewebe auf. \*  $p < 0.05$ .

### 5.1.3 Mausmodell

Auch im Mausmodell wurden Analysen der Hdac2 Expression vorgenommen und hierfür Mäuse vom C57BL/6 Wildtyp (WT) ( $n = 4$ ) und *CEA/Tag* Mäuse ( $n = 4$ ) verglichen. Übereinstimmend mit den oben beschriebenen Experimenten zeigt sich im Western Blot eine

erhöhte Proteinexpression von Hdac2 im Tumorgewebe (mediane Bandenintensität  $0.96 \pm 0.19$ ) der *CEA/Tag* Mäuse im Vergleich zum Normalgewebe (mediane Bandenintensität  $0.72 \pm 0.64$ ) der C57BL/6 Wildtyp Mäuse (Abbildung 11).



**Abbildung 11:** Oben ist eine Western-Blot Analyse von Pylorusgewebe im Hinblick auf deren HDAC2 Expression gezeigt, wobei Normalgewebe von Wildtyp Mäusen (WT) dem Tumorgewebe von *CEA/Tag* Mäusen gegenübergestellt ist.

Links graphische Darstellung der errechneten Bandenintensität  $\pm$  S.E, n = 10.

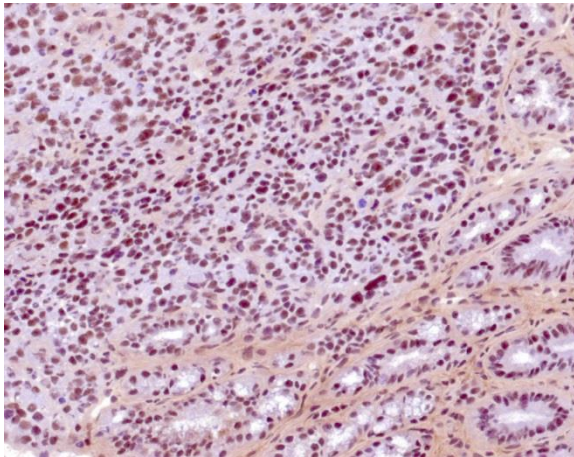
Um die Lokalisation der Hdac2 Expression im Mausmodell zu untersuchen, wurde zusätzlich eine immunhistochemische Färbung von Kryoschnitten des Magens angefertigt. Hierbei ergibt sich bei den *CEA/Tag* Mäusen das typische Bild eines infiltrativen Tumorstadiums mit Aufhebung der Drüsenstruktur, Zellatypien und unscharfer Abgrenzung zum Umgebungsgewebe; eine Tumorkapsel kann nicht identifiziert werden. Die Zellkerne erscheinen atypisch, vergrößert und hyperchromatisch, vereinbar mit Kernpolymorphie. Zeichen einer perifokalen Entzündung fehlen hingegen.

In den Tumorzellen wird eine hohe Expression von Hdac2 nachgewiesen, einhergehend mit einer starken nukleären Braunfärbung. Das Zytoplasma bleibt ungefärbt. Im gesunden Gewebe der Wildtyp Mäuse findet sich in den tubulären und alveolären Epithelien eine schwächer ausgeprägte Hdac2-Expression. Im Wildtyp imponiert ebenfalls Hdac2-Expression, die sich vor allem auf die foveolären und glandulären Strukturen erstreckt.

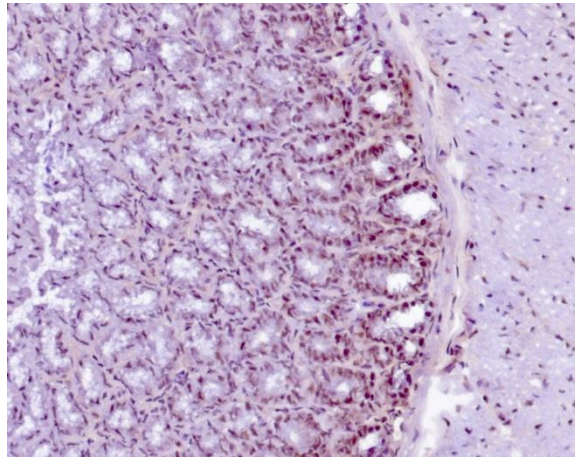


Zusammenfassend ergab die Immunhistochemie für Hdac2 eine Kernfärbung glandulärer Zellen in den C57BL/6 Wildtyp Mäusen; in den Tumorearealen der *CEA/Tag* Mäuse zeigte sich jedoch eine starke Hdac2 Expression (Abbildung 12).

**CEA/Tag**



**Wildtyp**



**Abbildung 12:** Repräsentative Bilder der immunhistochemischen nukleären Färbung von Hdac2 in C57BL/6 Wildtyp (WT) und Tumorgewebe von *CEA/Tag* Mäusen. Vergrößerung 200fach.

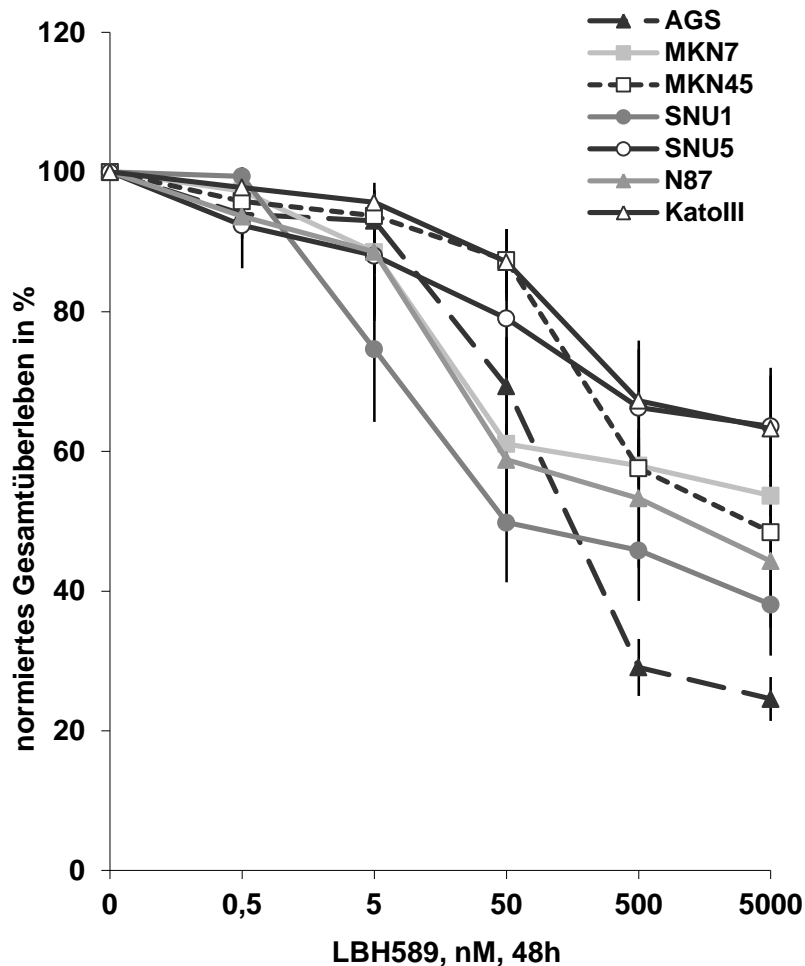
## 5.2 Wirkung von LBH589

### 5.2.1 Zelllinien

Um die potentiell antitumorale Wirkung von LBH589 auf die verwendeten Magentumorzelllinien zu untersuchen, wurden verschiedene Untersuchungen durchgeführt. Im MTT-Assay lassen sich dabei zum einen das Wachstumsverhalten bzw. die Proliferationsrate der Zellen im Proliferationsansatz und zum anderen Ausmaß der Sterblichkeit und Gesamtüberleben im Apoptoseansatz beobachten. Nach der Verstoffwechslung des zugegebenen Tetrazoliumsalzes 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid (MTT) durch vitale Zellen kommt es zu einer Farbreaktion, deren Intensität mit der Anzahl der vitalen Zellen korreliert und durch photometrische Messung bestimmt werden kann. Weiterführend wurde mit Hilfe von Colony Formation Assays die Ausbildung von Zellkolonien beobachtet. In diesem Experiment kann das Zellwachstum bzw. die Zellproliferation im Langzeitversuch verfolgt werden. Der Einfluss von LBH589 auf die enzymale HDAC Aktivität wurde mittels eines Enzymaktivitätsassays überprüft, bevor die Untersuchung der HDAC2-Degradation und Acetylierung auf Proteinebene im Western Blot folgte.

Initial wurde ein IC50 durchgeführt. Hierbei wird die halbmaximale inhibitorische Konzentration (*half minimal (50%) inhibitory concentration*: IC50) des Therapeutikums in den verschiedenen Zelllinien anhand einer Dosis-Wirkungs-Kurve ermittelt. In einem MTT-Assay

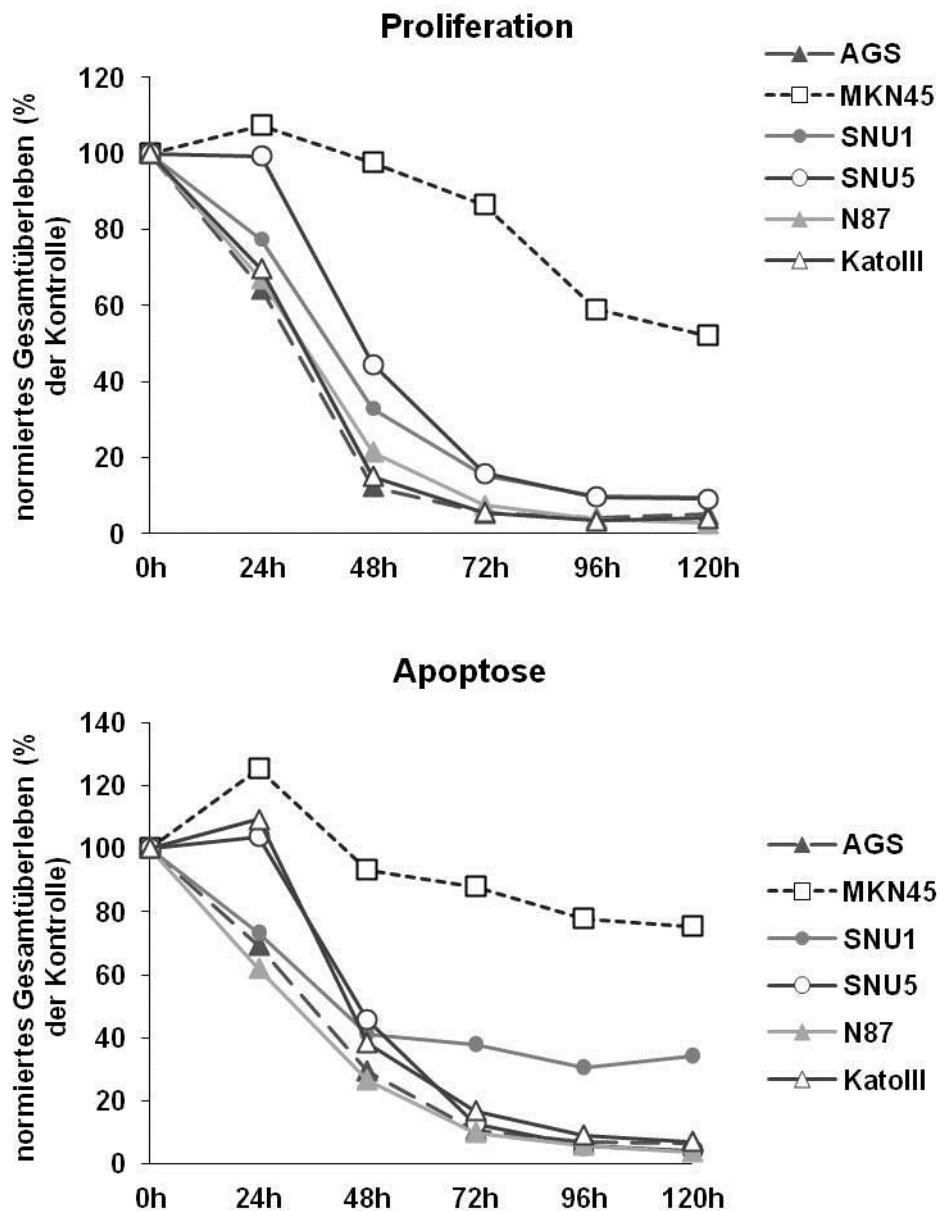
wurden die Zellen mit ansteigenden LBH589 Konzentrationen im Bereich von 0 – 5000 nM inkubiert und das Gesamtüberleben bestimmt. Nach 48 h zeigt sich eine wirksame Inhibition von Zellproliferation und Verringerung des Gesamtüberlebens bei IC50-Werten von 20 nM - 100 nM (Abbildung 13).



**Abbildung 13:** IC<sub>50</sub> von LBH589 (0 – 5.000 nM, Endpunkt 48 h) ermittelt für die sieben Magentumorzelllinien (AGS, MKN7, MKN45, SNU1, SNU5, N87, KATOIII) im MTT-Assay (20.000 Zellen / Well). Das Gesamtüberleben wurde aus dem Vergleich mit der normierten Kontrollgruppe ermittelt, die aus mit Medium behandelten Zellen bestand. 100% ± S.D. (n = 4).

Für die Analyse der zeitabhängigen Wirkungsweise von LBH589 folgten weitere MTT-Assays, wobei ein gemittelter IC<sub>50</sub> Wert der LBH589 Konzentration verwendet wurde. Die Zellen wurden hierbei mit einer konstanten LBH589 Konzentration von 100 nM behandelt und das Wachstum jeweils in 24 h Intervallen abgestoppt, wobei 120 h den Endpunkt darstellte. Als Kontrollgruppe dienten Zellen unter Kulturmedium. Im Proliferationsassay ergibt sich unter LBH589 eine deutliche Verringerung der Proliferationsrate, so dass nach 48 h nur noch  $12,42 \pm 0,006$  % der AGS-Zellen Viabilität zeigen; das natürliche Wachstumsverhalten der Zellen wird hier massiv unterdrückt. Nach 72 h ist in der überwiegenden Zahl der Zellpopulationen kaum noch Viabilität messbar, vereinbar mit der

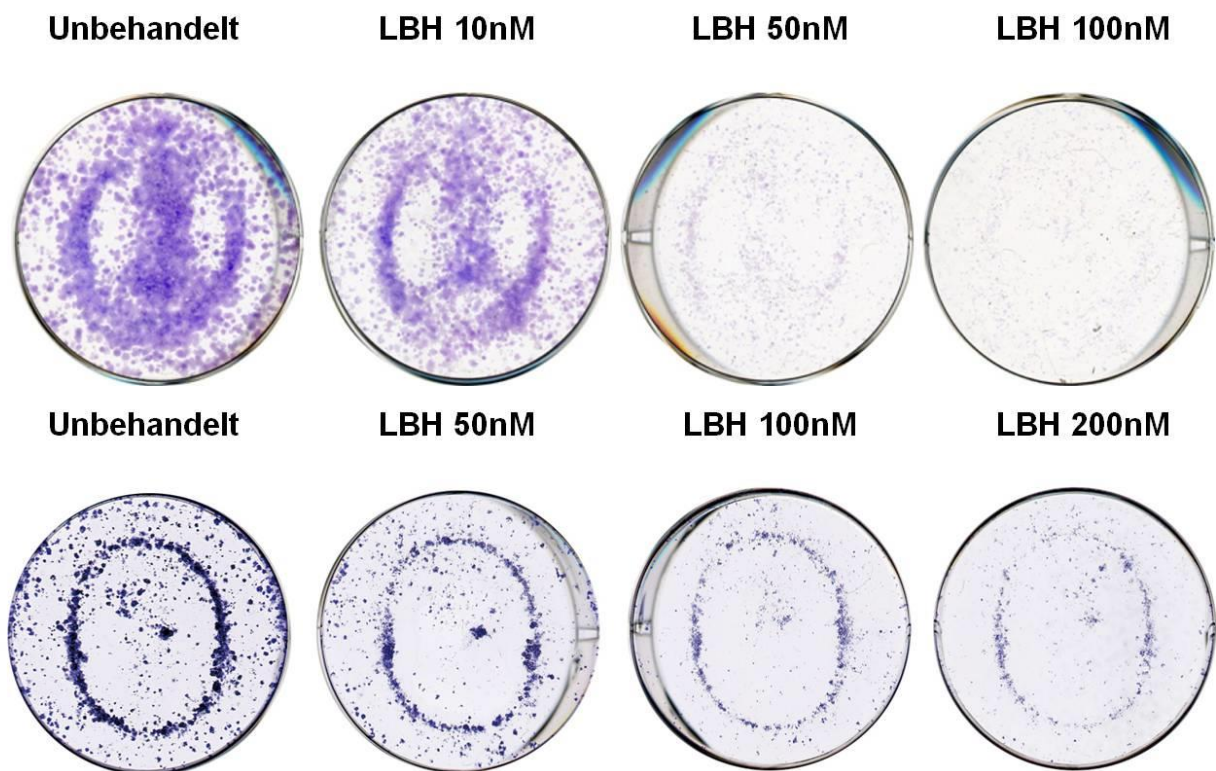
Feststellung nicht länger existenter vitaler Zellen (Abbildung 14, oben). Es lässt sich also festhalten, dass LBH589 die Proliferation der Magentumorzellen bereits mit dem Zeitpunkt der ersten Applikation signifikant hemmt. Ein ähnliches Ergebnis ist im Apoptoseexperiment zu beobachten (Abbildung 14, unten), wenngleich nach 48 h lediglich eine Reduktion auf 30 - 40 % erzielt werden kann. Gegenüber proliferierenden Zellen entwickelt LBH589 somit offenbar eine größere therapeutische Effizienz als gegenüber den Tumorzellen im Apoptoseexperiment. Eine Ausnahme bilden in beiden Assays die Zellen der MKN45 Gruppe, die eine gesteigerte Resistenz gegenüber der LBH589 Behandlung aufweisen, so dass am Endpunkt lediglich eine Reduktion auf  $52,13\% \pm 0.043$  im Proliferations- und auf  $75,19\% \pm 0.18$  im Apoptoseexperiment erreicht werden kann, was einem prolongierten Gesamtüberleben entspricht.



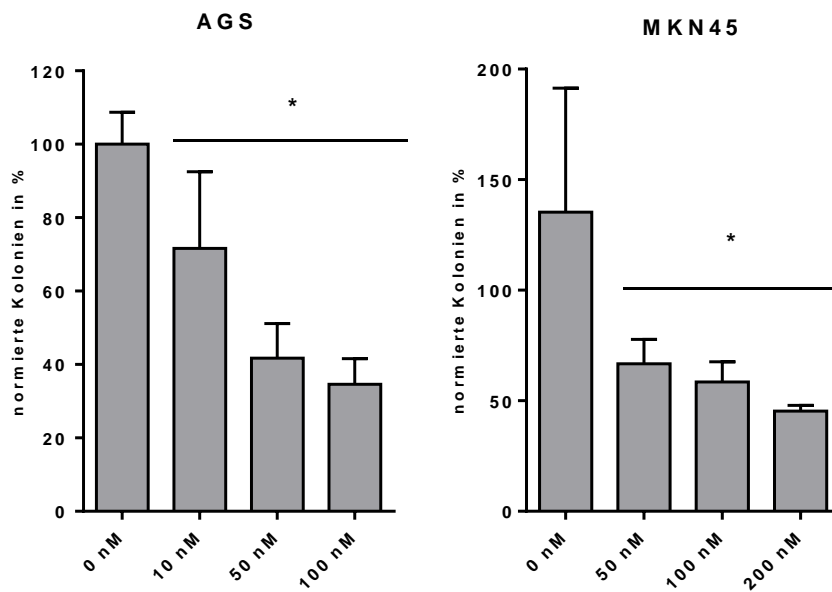
**Abbildung 14:** MTT-Assay zur Darstellung der zeitabhängigen Wirkung von LBH589; Proliferations- und Apoptosekurven für alle sieben Magentumorzelllinien (AGS, MKN7, MKN45, SNU1, SNU5, N87, KATOIII) (5.000 bzw. 20.000 Zellen / Well). Behandlung mit 100 nM über 0 – 120 h. 100% ± S.D. (n = 2).

Um das Wachstumsverhalten und die Fähigkeit der Koloniebildung der Zellen im Langzeitversuch zu beobachten, wurden Colony Formation Assays durchgeführt. Hierbei werden die Zellen stark vereinzelt (5000 Zellen / 6-Well) und für 24 h unter den entsprechenden Behandlungsbedingungen kultiviert. Im Anschluss wird das Therapeutikum entfernt, durch Kulturmedium ersetzt und das Zellwachstum über eine Dauer von 14 Tagen fortgesetzt. Schließlich werden die Kolonien gefärbt und deren Dichte mit Hilfe der ImageJ Software (National Institutes of Health, Bethesda, USA) berechnet. Es zeigt sich, dass es unter steigenden Konzentrationen von LBH589 schon nach 24 h Behandlungszeit zu einer

eingeschränkten Koloniebildung und Inhibierung der damit einhergehenden Zellproliferation kommt, die auch in den folgenden 13 behandlungsfreien Tagen nicht kompensiert werden kann und somit in eine deutliche Reduktion der Kolonien resultiert. Für AGS-Zellen wurden LBH589 Konzentrationen von 10 nM bis 100 nM verwendet, wobei sich bereits für Konzentrationen von 50 nM eine Reduktion der Koloniedichte auf  $41,70 \pm 10,14$  % erzielen lässt (Abbildung 15 und 16). Bei den MKN45-Zellen wird eine Verringerung der Koloniedichte auf  $45,33 \pm 2,82$  % erst bei der Maximalkonzentration von 200 nM erreicht (Abbildung 15 und 16).



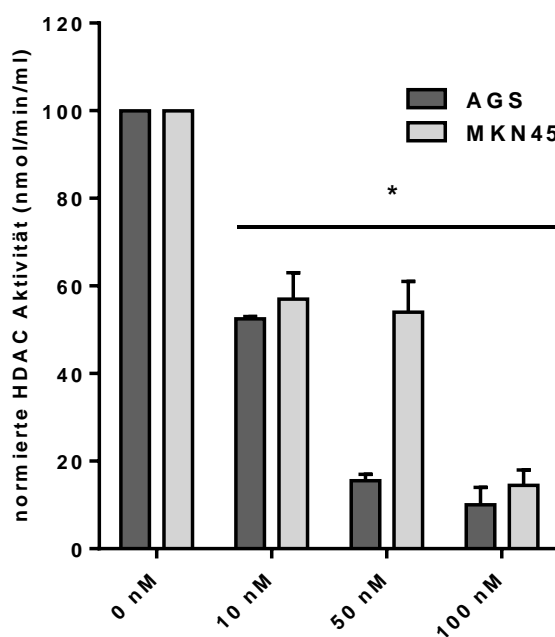
**Abbildung 15:** Colony Formation Assay der AGS und MKN45-Zellen, behandelt mit unterschiedlichen Konzentrationen LBH589 (0 – 200 nM) für 24 h; anschließende Kultivierung unter Medium für weitere 13 Tage.



**Abbildung 16:** Colony Formation Assay der AGS- und MKN45-Zellen. Die Dichte der Kolonien wurde mit Hilfe der ImageJ Software berechnet  $\pm$  S.E. (n = 5). \* p < 0.05

### 5.2.2 Enzymaktivitätsassay

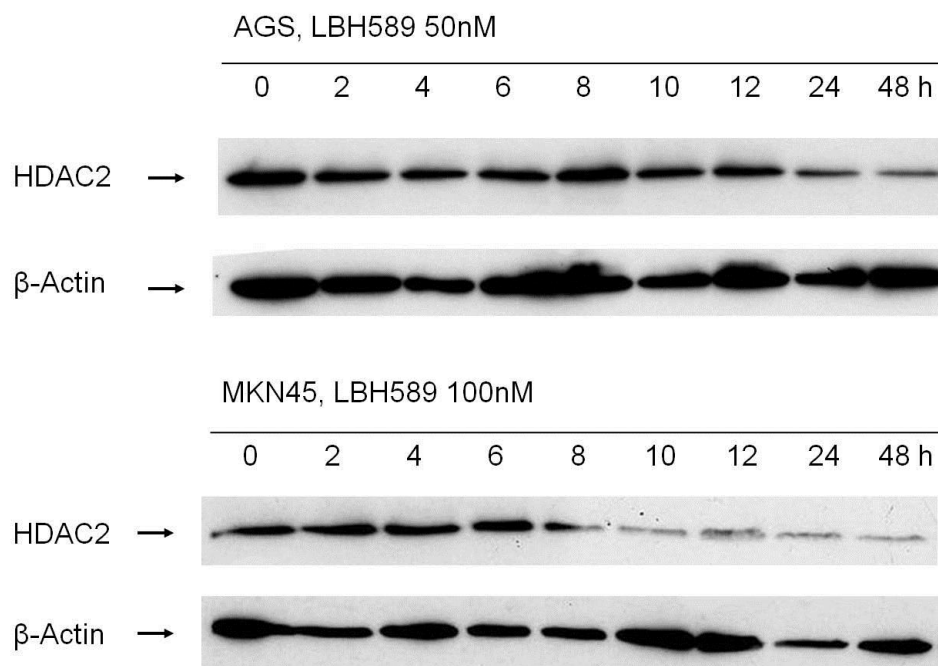
Um die Wirkung von LBH589 auf die enzymale HDAC Aktivität quantifizieren zu können, wurde ein Enzymaktivitätsassay mit nukleären Extrakten der behandelten AGS- und MKN45-Zellen durchgeführt. Bei einer LBH589 Konzentration von 50 nM lässt sich für die AGS-Zellen eine Reduktion der HDAC-Enzymaktivität auf  $15,32 \pm 1,87$  % erreichen, wohingegen für die MKN45-Zellen eine Konzentration von 100 nM erforderlich ist, um ein ähnlich effektives Ergebnis ( $14,51 \pm 4,55$  %) zu erzielen (Abbildung 17).



**Abbildung 17:** Nukleäre Extrakte von AGS und MKN45-Zellen wurden mit unterschiedlichen LBH589 Konzentrationen (0 – 100 nM) inkubiert, die photometrische Aktivität gemessen und nach Angaben des Herstellers berechnet  $\pm$  S.E. (n = 3) in nmol / min / ml. \* p < 0.05

### 5.2.3 HDAC Degradation

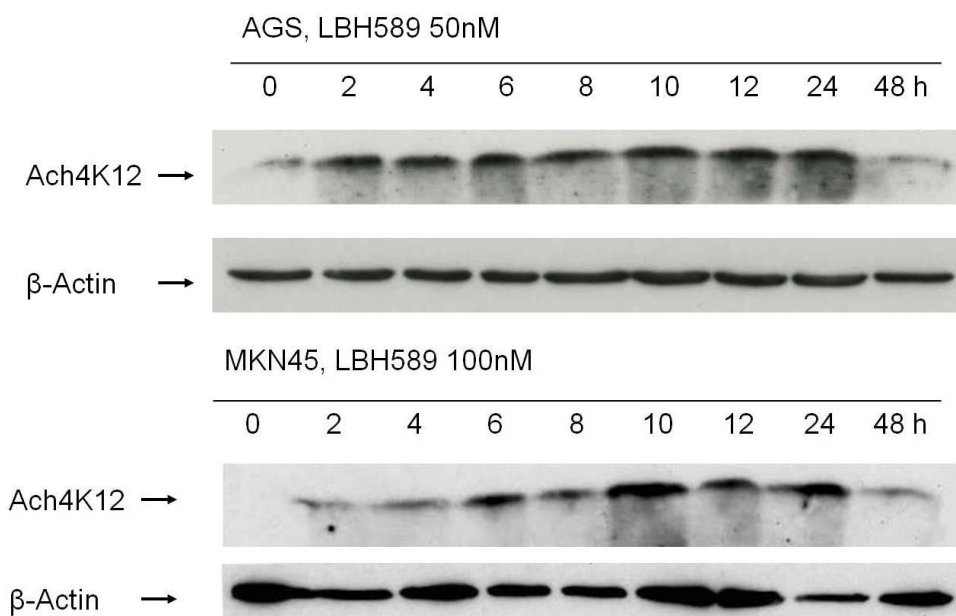
Da nun der Beweis für die Verringerung der HDAC Enzymaktivität durch LBH589 erbracht ist, gilt es auch im Western Blot nachzuweisen, dass LBH589 zu einer Reduktion der HDAC2-Proteinlevel führt. Für dieses Experiment wurden AGS-Zellen mit LBH589 50 nM behandelt und die Proteine zu bestimmten Zeitpunkten isoliert. Im Western Blot ist eine Abnahme des HDAC2 Proteins nach 24 h zu beobachten. Ein vergleichbares Ergebnis zeigt sich auch für die MKN45-Zellen, wobei hier bereits eine Verringerung der HDAC2 Expression bereits nach zehnstündiger Behandlungsdauer sichtbar ist. (Abbildung 18).



**Abbildung 18:** Western Blot Analyse von AGS- und MKN45-Zellen behandelt mit LBH589 50 nM bzw. 100 nM über zunehmende Zeitintervalle; Endpunkt 48 h.  $\beta$ -Actin diente als Ladekontrolle.

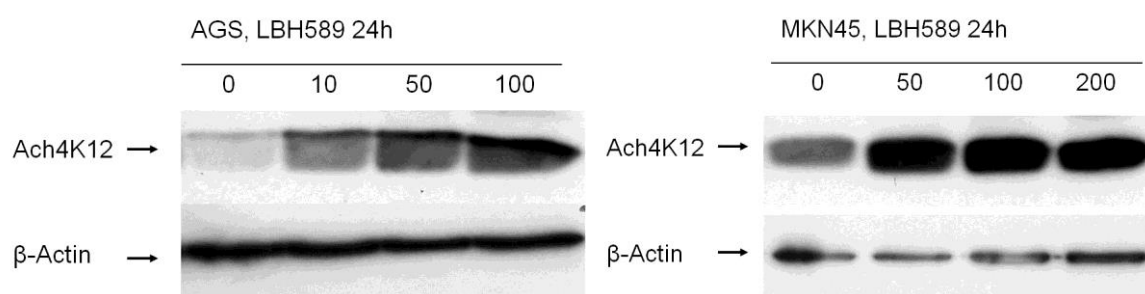
### 5.2.4 Acetylierung

Neben der Verringerung der Expression von HDAC2 stellt die vermehrte Acetylierung von Histonen einen wesentlichen Effekt von LBH589 dar. Um den Einfluss von LBH589 auf den Acetylierungsgrad von Proteinen zu untersuchen, wurden ebenfalls Western Blots durchgeführt. Es kann in den beiden verwendeten Zelllinien (AGS und MKN45) sowohl ein zeit- als auch ein dosisabhängiger Anstieg der Histonacetylierung gezeigt werden. So beginnt die Zunahme der Acetylierung bereits nach zweistündiger Behandlung und erreicht ihr Maximum circa zwischen 10 und 24 h (Abbildung 19).



**Abbildung 19:** Western Blot Analyse von AGS- und MKN45-Zellen behandelt mit LBH589 50 nM bzw. 100 nM über zunehmende Zeitintervalle; Endpunkt 48 h. Untersucht wird der Acetylierungsgrad der Histone.  $\beta$ -Actin diente als Ladekontrolle.

Ebenso findet sich eine Abhängigkeit zwischen steigenden LBH589 Konzentrationen und zunehmender Acetylierung, was besonders bei den AGS-Zellen deutlich wird (Abbildung 20).



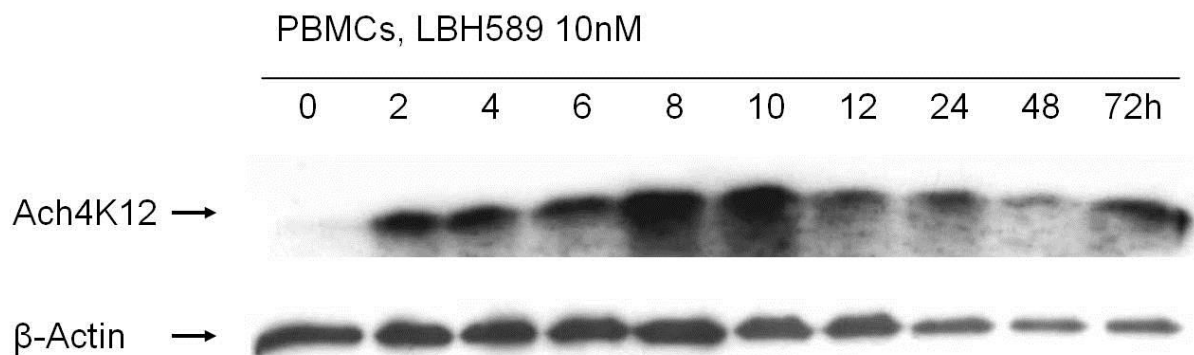
**Abbildung 20:** Die Western Blots zeigen den dosisabhängigen Anstieg acetylierter Histone bei mit LBH589 behandelten AGS- und MKN45-Zellen.

#### 5.2.4.1 Acetylierung mononukleärer Zellen des peripheren Blutes

Zusätzlich zu den Magentumorzelllinien wurde der Effekt von LBH589 auf die Acetylierung überdies in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) untersucht, um so einer möglichen Anwendung des Medikamentes beim Menschen Rechnung zu tragen und Rückschlüsse auf dessen pharmakodynamisches Verhalten ziehen zu können. Die Zellen wurden wie in 4.9 dargelegt aus dem Blut gesunder Probanden isoliert und nach unten genannten Bedingungen kultiviert und behandelt. In Übereinstimmung mit den in 5.2.4 gemachten Beobachtungen lässt sich in Abbildung 21 unter der Behandlung mit 10 nM

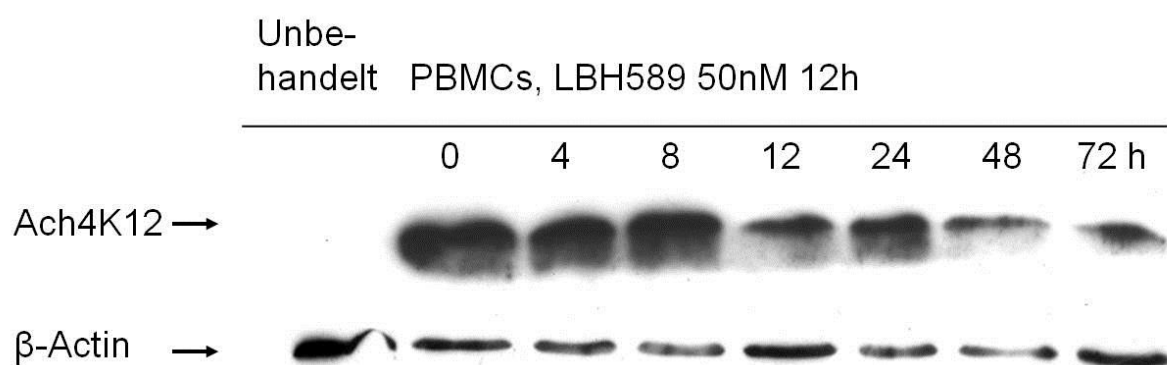


LBH589 ein ähnliches Acetylierungsmuster erkennen wie in Abbildung 19. Nach bereits 2 h lassen sich acetylierte Histone nachweisen, deren Konzentration nach 8 bis 10 h ihr Maximum erreicht.



**Abbildung 21:** Western Blot zur Darstellung der Histon-Acetylierung von PBMCs des peripheren Blutes. Die Behandlung mit LBH589 10 nM erfolgte über ansteigende Zeitintervalle. β-Actin diente als Ladekontrolle.

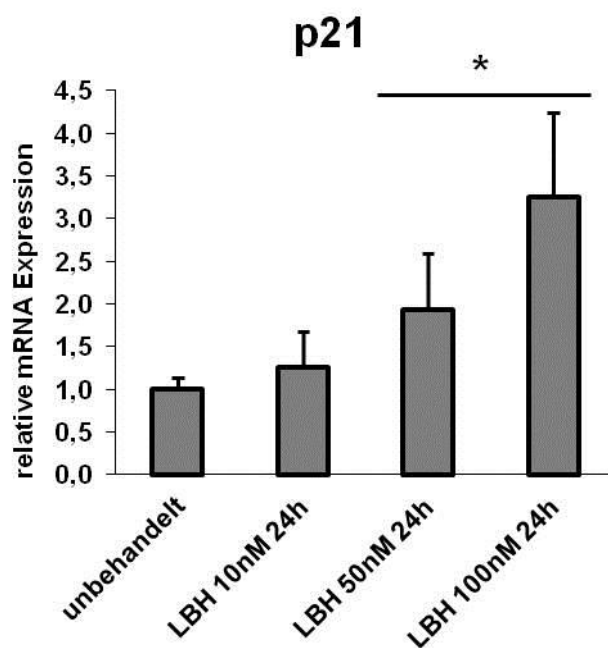
Nachdem die Histon-Acetylierung der mononukleären Zellen unter kontinuierlicher LBH589 Therapie nachgewiesen werden konnte, galt es zu untersuchen, wie lange diese nach Absetzen der Behandlung noch nachweisbar ist. Die Aufklärung dieser Frage ist vor allem im Hinblick auf die Anwendung in der Magentumorthotherapie beim Menschen von außerordentlicher Bedeutung. Dazu wurden die PBMCs über 12 h mit LBH589 50 nM vorbehandelt und im Anschluss unter Normalmedium über die genannten Zeiträume kultiviert. 0 bis 8 h nach Entfernung des LBH589 ist eine starke Acetylierung sichtbar, die in der Folge abnimmt, jedoch auch 72 h nach Behandlungsende noch zu beobachten ist (Abbildung 22). Somit können PBMCs und deren Acetylierung unter LBH589 Behandlung als Marker für Therapiekontrolle Verwendung finden.



**Abbildung 22:** Western Blot. Die Leukozyten wurden mit LBH589 50 nM für 12 h vorbehandelt und anschließend in Medium kultiviert; die Proteinisolierung wurde zu oben genannten Zeitpunkten vorgenommen. Die unbehandelten Zellen dienten als Kontrolle; β-Actin als Ladekontrolle.

### 5.3 Reaktivierung von p21

Wie in der Einleitung beschrieben, wird die antitumorale Wirkung von LBH589 über verschiedene Mechanismen vermittelt. Neben der HDAC2 Degradation und Histonacetylierung spielt hierbei auch die Reaktivierung des Tumorsuppressorgens *CDKN1A* (p21) eine wichtige Rolle. Um zu prüfen, inwieweit eine Behandlung mit LBH589 Einfluss auf die Expression dieses Gens hat, wurde eine Q-PCR mit behandelten AGS-Zellen durchgeführt (Abbildung 23). Während sich bei einer Konzentration von 10 nM kein wesentlicher Einfluss zeigt, kann bei einer Behandlung mit 50 nM eine nahezu zweifach ( $1,93 \pm 0,65$ ), bei einer Konzentration von 100 nM gar eine über 3-fach erhöhte p21 Expression ( $3,25 \pm 0,99$ ) beobachtet werden.



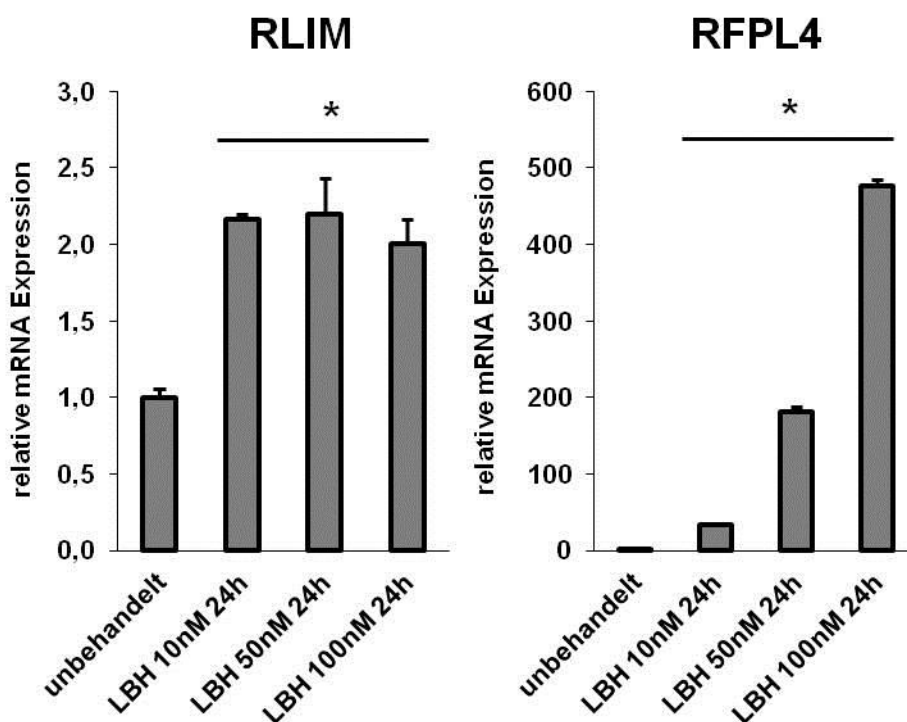
**Abbildung 23:** RT-PCR. AGS-Zellen wurden für 24 h mit verschiedenen LBH589 Konzentrationen (0 – 100 nM) behandelt. Es lässt sich eine dosisabhängige Reaktivierung der p21 Expression nachweisen  $\pm$  S.D. (n = 3).

### 5.4 Proteindegradation

Die Proteindegradation spielt neben anderen pharmakologischen Angriffspunkten vermutlich eine wesentliche Rolle im Wirkungsmechanismus von LBH589. Dies konnte erstmals 2003 durch Kramer *et al.* gezeigt und in dieser Arbeit bestätigt werden. In diesem Zusammenhang haben wir uns auf das Zink-Finger Protein RLIM fokussiert, von dem bekannt ist, dass es als E3-Ubiquitin-Protein-Ligase für die proteasomale Degradation von HDAC2 verantwortlich ist. Eine vermehrte Expression dieses Proteins resultiert also in einem gesteigerten proteasomalen Abbau von HDAC2 und führt offenbar zur Apoptose (Kramer *et al.*, 2003). Zur Untersuchung der *RLIM* Expression unter LBH589 Therapie, behandelten wir AGS-Zellen über 24 h und analysierten dann mittels Q-PCR den Anstieg der mRNA Konzentration. Es zeigt sich eine 2-fach erhöhte Expression gegenüber den unbehandelten Zellen ( $2,19 \pm 0,24$ ).

bei 50 nM LBH589), wobei allerdings keine Dosisabhängigkeit bezüglich der LBH589 Konzentration zu beobachten ist.

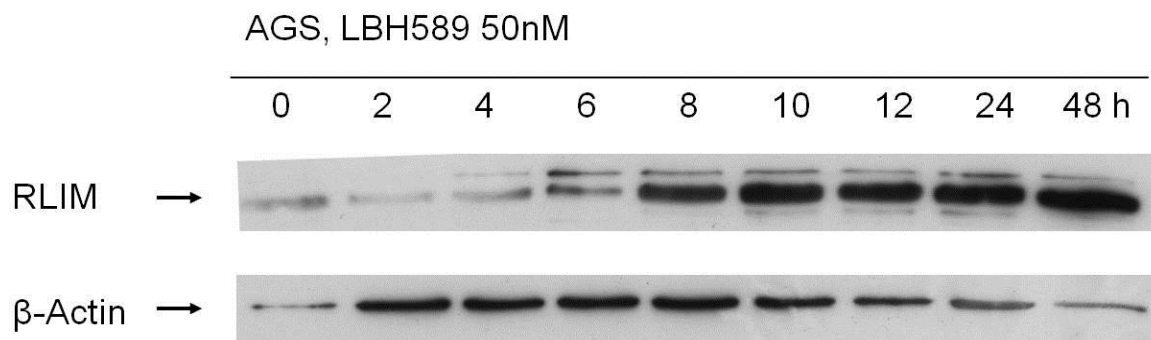
Neben *RLIM* untersuchten wir außerdem *Ret Finger-Protein-like 4 (RFPL4)*, ein Gen, welches ebenfalls für eine E3-Ubiquitin-Ligase kodiert und somit im Verdacht steht, an der Proteindegradation von HDAC2 beteiligt zu sein (Rajkovic et al., 2002; Suzumori et al., 2003). Auch hier kann unter LBH589 Therapie (Bedingungen wie oben) eine erhöhte Expression nachgewiesen werden, die überdies dosisabhängig ist. So lässt sich bei Konzentrationen von 10 nM LBH589 eine 30-fach ( $33,53 \pm 2,63$ ), bei 100 nM LBH589 dagegen eine über 400-fach ( $476,11 \pm 9,33$ ) gesteigerte Expression beobachten. Es kann also gezeigt werden, dass LBH589 die Genexpression bestimmter Ligasen induziert und auf diesem Wege zu einer Proteindegradation von HDAC2 führen kann.



**Abbildung 24:** Q-PCR zur Darstellung der Expression von RLIM und RFPL4. Es wurden AGS-Zellen über 24 h mit unterschiedlichen LBH589 Konzentrationen (0 - 100 nM) behandelt, Werte normiert auf ein Haushaltsgen  $\pm$  S.D. (n = 2)

#### 5.4.1 Western Blot

Zusätzlich zum Nachweis auf RNA Ebene prüften wir die Proteinlevel von RLIM während LBH589 Therapie mit Hilfe des Western Blots. Auch auf Proteinebene ist ein Anstieg der RLIM Expression mit einer Latenzzeit von 6 bis 8 h nach Behandlungsbeginn sichtbar und somit wahrscheinlich für die HDAC2 Proteindegradation unter LBH589 Behandlung verantwortlich.

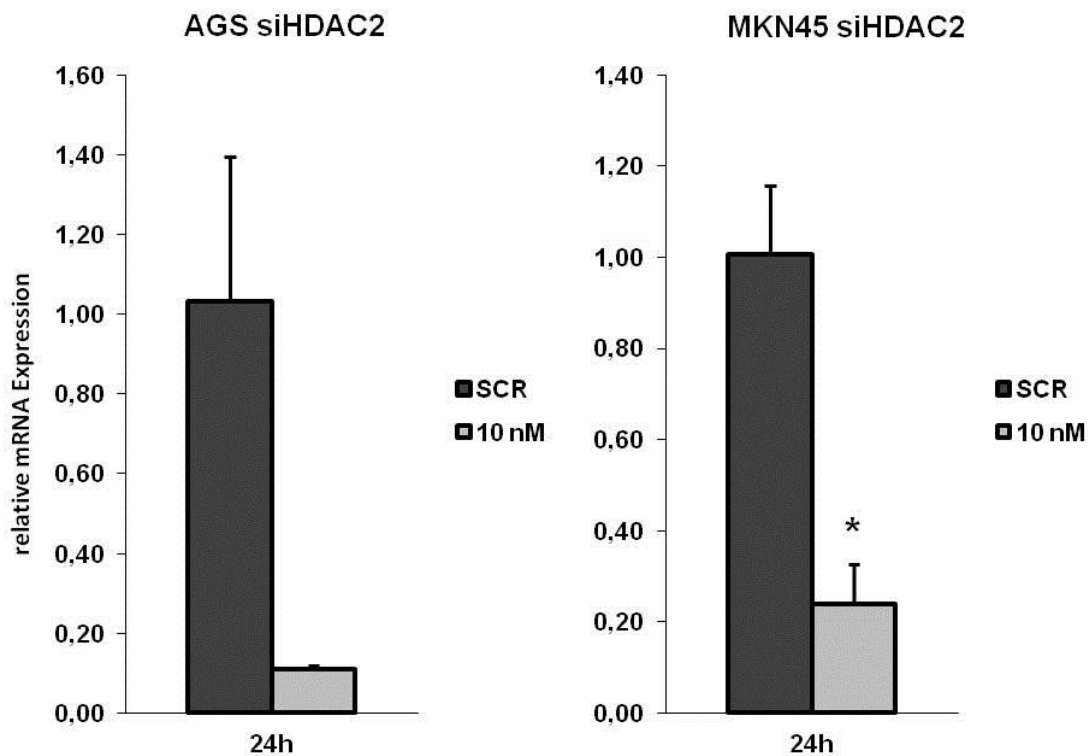


**Abbildung 25:** Western Blot. Behandlung von AGS-Zellen über die angegebenen Zeiträume mit 50 nM LBH589.

## 5.5 HDAC Knockdown

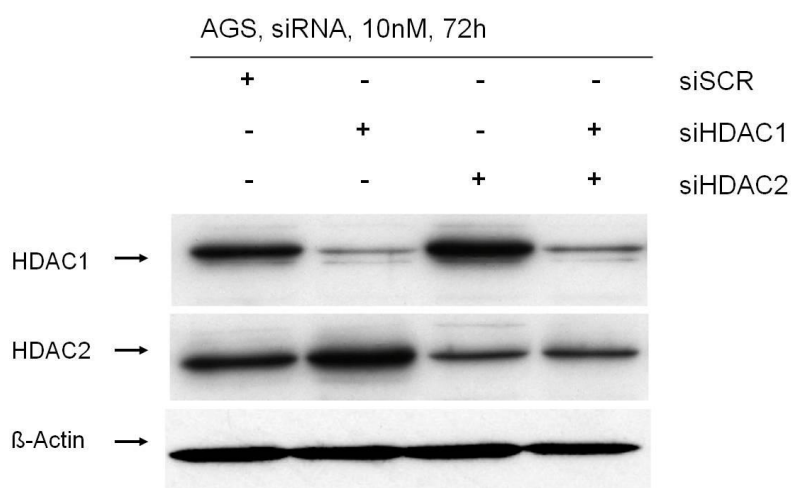
### 5.5.1 Verminderte Proliferation

Wie bereits in Kapitel 5.1 gezeigt, stellt die Überexpression von HDAC2 einen negativen prognostischen Faktor dar und steht im Verdacht für Chemoresistenz verantwortlich zu sein (Song et al., 2005; Weichert et al., 2008). Abgeleitet von dieser Beobachtung ergibt sich die Frage, ob eine Herunterregulation von HDAC1 oder HDAC2 mit Hilfe von siRNA zu einer verringerten Proliferation oder gar einer gesteigerten Chemosensitivität führt. Um dies zu klären, wurden AGS- und MKN45-Zellen für 72 h mit 10 nM siRNA behandelt und das Proliferationsverhalten in der Folge mit Hilfe eines MTT-Assays bestimmt. In Abbildung 26 ist das Ergebnis der Q-PCR zur Quantifizierung des spezifischen Knockdowns für HDAC2 in AGS und MKN45 dargestellt. Bereits 24 h nach der Transfektion kann eine Herunterregulation um  $89,32 \pm 0,01$  für AGS-Zellen und um  $76,23 \pm 0,09$  für MKN45-Zellen nachgewiesen werden.



**Abbildung 26:** Q-PCR zur Quantifizierung des HDAC2 Knockdowns nach 24-stündiger Transfektion der Zellen mit 10 nM HDAC2 siRNA  $\pm$  S.D. Die mit siSCR transfizierten Zellen stellen die Leervektorkontrolle dar (n = 2). \*p < 0.069.

In der Western Blot Analyse zeigt sich ein korrespondierendes Ergebnis für AGS-Zellen auf der Proteinebene (Abbildung 27). Nach 72 stündiger Transfektion ist für HDAC1 und HDAC2 im Vergleich zu der mit ungerichteter, „scramble“ siRNA transfizierten Kontrollgruppe (siSCR) ein spezifischer Knockdown des jeweiligen Proteins zu beobachten.

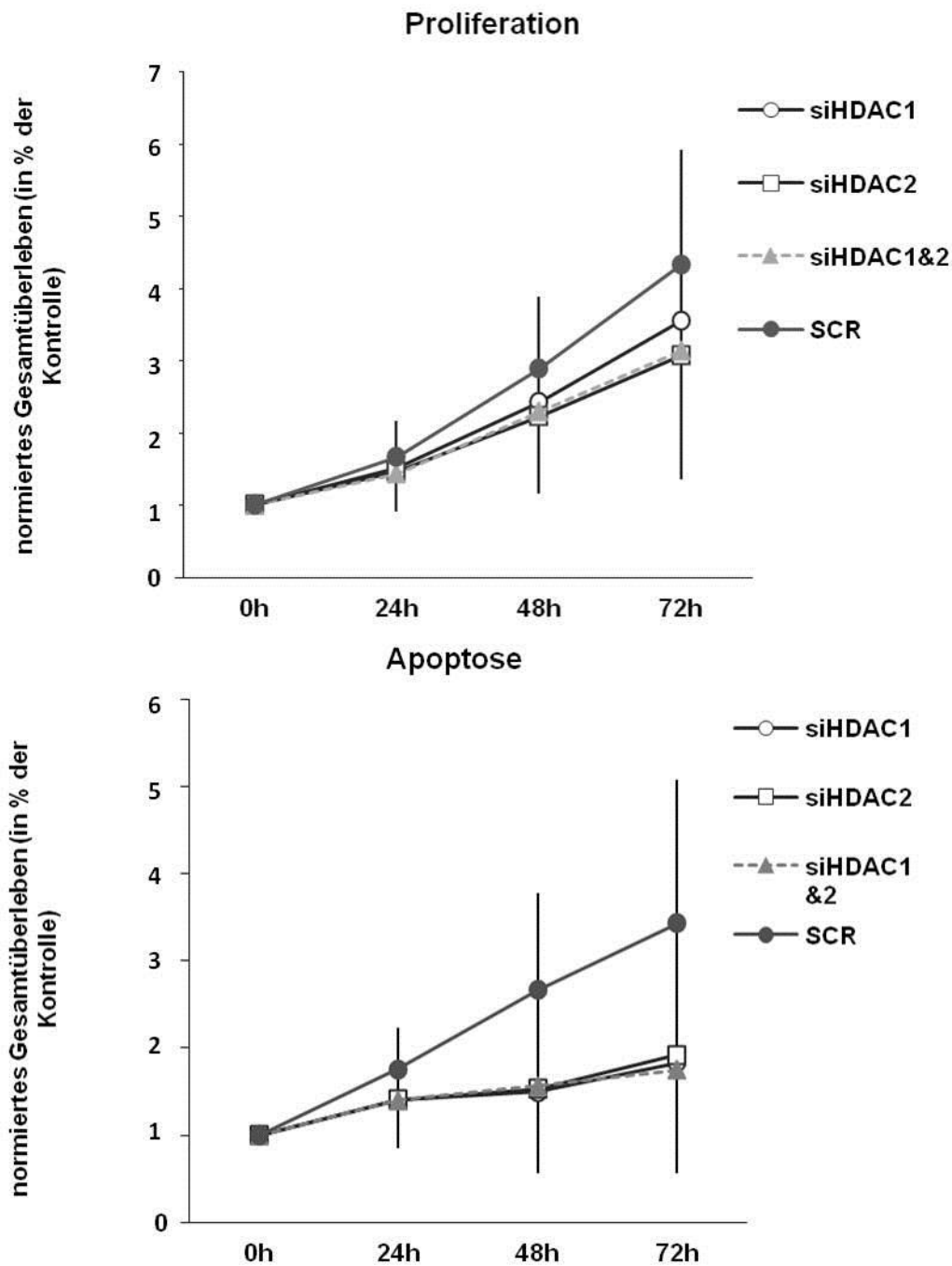


**Abbildung 27:**

Western Blot Analyse zur Quantifizierung von HDAC1 und HDAC2 Protein in siRNA transfizierten AGS-Zellen (Transfektion mit 10 nM scramble, HDAC1, HDAC2 siRNA über 72 h).

Für die Untersuchung des Proliferations- bzw. Apoptoseverhaltens mittels MTT wurden siRNA transfizierte AGS-Zellen in einer Dichte von 5.000 bzw. 20.000 Zellen / Well ausgesät und das Wachstum über eine Dauer von 72 h ohne weitere Behandlung beobachtet (Abbildung 28). Es findet sich eine Abnahme der Proliferation, wobei dieser Effekt

insbesondere bei den siHDAC1&2 (Reduktion um  $27,48 \pm 1,40$  %) und siHDAC2 ( $29,09 \pm 1,71$  %) transfizierten Zellen nachzuweisen ist. Ein alleiniger Knockdown von HDAC1 hat lediglich eine geringe Auswirkungen auf das Wachstumsverhalten (Verringerung der Proliferation um  $17,78 \pm 2,09$  %). Im Apoptoseassay offenbart sich dagegen ein deutlich stärkerer Einfluss des Knockdowns auf das Überleben der Zellen. Die drei Gruppen zeigen für ihre jeweiligen Knockdowns (siHDAC1, siHDAC2 und siHDAC1&2) im Vergleich schlechtere Überlebensraten als die nicht-transfizierte Kontrollgruppe; exemplarisch ein um bis zu  $48,98 \pm 1,19$  % reduziertes Gesamtüberleben der siHDAC1&2 transfizierten Zellen versus der Kontrollgruppe. Ein unterschiedliches Verhalten zwischen siHDAC1 und 2 ist bei diesem Experiment hingegen kaum zu beobachten. Es lässt sich also feststellen, dass die Proliferation durch den Knockdown von HDAC1&2 deutlich weniger beeinträchtigt ist, als das Gesamtüberleben im Apoptoseansatz.

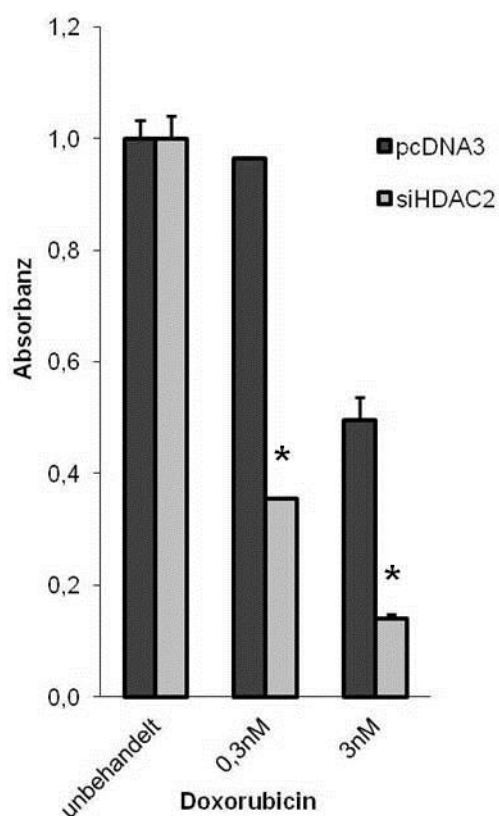


**Abbildung 28:** MTT-Assay zum Wachstumsverhalten der mit siRNA transfizierten AGS-Zellen. Die siSCR transfizierten Zellen dienten als Kontrollgruppe. Unbehandeltes Wachstum über 72 h.  $100\% \pm \text{S.D.}$ ;  $n = 3$ .

### 5.5.2 Verminderte Chemoresistenz

Nachdem in Absatz 5.5.1 gezeigt werden konnte, dass ein Knockdown von HDAC2 in Magentumorzelllinien eine verminderte Proliferation und gesteigerte Apoptose zur Folge hat, soll im Folgenden der Einfluss reduzierter HDAC2 Expression auf das Ansprechen chemotherapeutischer Reagenzien untersucht werden. Zunächst wurde dies in einem unabhängigen Zellsystem analysiert. HeLa-Zellen wurden mit siRNA gegen HDAC2

transfiziert und entsprechend der in 5.5.1 genannten Konditionen ausgesät. 72 h nach der Transfektion wurden die Zellen mit verschiedenen Doxorubicin-Konzentrationen behandelt und nach 24 h das Zellüberleben gemessen. Im Apoptose-Ansatz ist ein deutlich verringertes Gesamtüberleben in der mit siHDAC2 transfizierten Zellpopulation zu beobachten (Abbildung 29). Unter der Behandlung mit 0,3 nM Doxorubicin zeigt sich eine Reduktion der Zellviabilität im Vergleich zu der mit dem Leervektor transfizierten Kontrollgruppe:  $35,4 \pm 0.002$  % siHDAC2 gegenüber  $96,4 \pm 0.003$  % pcDNA3. Bei einer Konzentration von 3 nM Doxorubicin ist ein vergleichbares Ergebnis zu verzeichnen:  $13,9 \pm 0.009$  % siHDAC2 gegenüber  $49,6 \pm 0.04$  % pcDNA3. Diese Ergebnisse lassen die Hypothese zu, dass eine reduzierte HDAC2 Expression, sei sie nun durch Transfektion mit siRNA oder medikamentös induziert, zu einer verminderten Resistenz gegenüber Anthrazyklin-Chemotherapeutika führen und somit neue Ansätze für Behandlungsstrategien implizieren kann.



**Abbildung 29:** MTT-Assay zur Untersuchung der Chemoresistenz von siHDAC2 transfizierten HeLa-Zellen. Darstellung des Wachstumsverhaltens nach 24 h unter Behandlung mit verschiedenen Doxorubicin Konzentrationen (0,3 nM, 3 nM). pcDNA3 fungierte als Leervektor und stellte die Kontrollgruppe dar.  $100\% \pm$  S.D.,  $n = 2$ .

## 5.6 Kombinationstherapie

### 5.6.1 Anthrazyklin-Resistenzgene

In einem korrespondierenden Projekt von Regel *et. al.* wurde die globale Genexpression von LBH589-behandelten AGS-Zellen mit Hilfe eines Microarrays untersucht. Hierzu wurde die Zellpopulation für 48 h mit LBH589 100 nM, beziehungsweise einem Vehikel zur Negativkontrolle inkubiert und anschließend die mRNA isoliert. Unter Zuhilfenahme einer *Gene Set Enrichment Analysis (GSEA)* gelang es, eine Gruppe von Genen zu identifizieren,



die in Doxorubicin-resistenten Magentumorzelllinien eine signifikante Hochregulation zeigt (Kang et al., 2004; Subramanian et al., 2005). In den LBH589-behandelten AGS-Zellen waren diese Doxorubicin-Resistenzgene jedoch herunterreguliert, was auch anschließend in der Q-PCR verifiziert werden konnte (Regel et al., 2012). Im Vergleich zu den Zellen der Negativkontrolle wiesen die behandelten AGS-Zellen eine Suppression der Resistenzgene (unter anderem *FOXM1*, *HMGB2* und *TYMS*) auf, womit gezeigt wurde, dass es unter LBH589 zu einer veränderten Genexpression mit einer Inaktivierung von Doxorubicin-Resistenzgenen kommt. Zudem konnte eine reduzierte HDAC2 Expression in Magentumorzellen das Ansprechen auf Anthrazyklin-Chemotherapeutika verbessern und so eine Verringerung der Doxorubicin-Konzentration bei gleichem Wirkungserfolg ermöglichen. Diese Beobachtungen lassen die Kombinationstherapie als rationale Behandlungsoption erscheinen. Vor diesem Hintergrund soll untersucht werden, ob es mit Hilfe von LBH589 möglich ist, Magentumorzellen für die Anthrazyklin-Therapie zu sensibilisieren und somit die Resistenz gegenüber der Chemotherapie zu reduzieren.

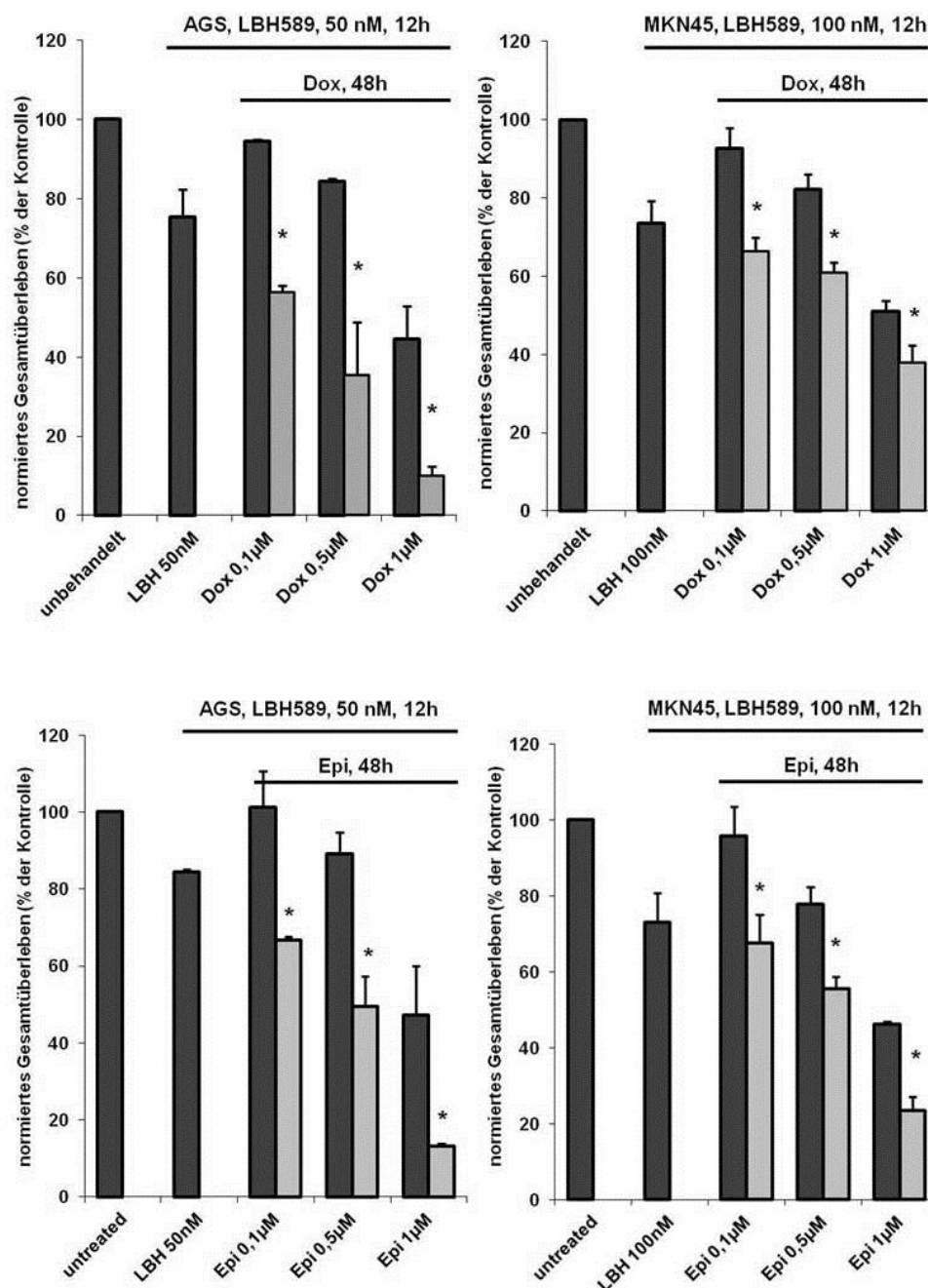
### 5.6.2 MTT-Assay

Sowohl der spezifische Knockdown von HDAC1/HDAC2 als auch die Doxorubicin-Behandlung konnten eine reduzierte Proliferation und ein verringertes Gesamtüberleben der Magentumorzellen bewirken. Die Hoffnung ist also, dass die Kombination dieser beiden Mechanismen eine bessere Wirkung gegenüber Tumorzellen entwickelt. Daher soll im Folgenden die medikamentös induzierte Inhibierung von HDAC2 und deren Einfluss auf konventionelle Chemotherapeutika analysiert werden. Falls es gelänge, durch eine Inhibition von HDAC2 das Therapieansprechen der Tumorzellen zu verbessern und so eine Reduktion der nötigen Zytostatikadosis zu erreichen, hätte dies für Patienten eine verringerte Toxizität zur Folge.

Für die Kombinationstherapie wurden die Zellen 12 h mit LBH589 vorbehandelt und im Anschluss mit Anthrazyklin-Chemotherapeutika inkubiert. Die Beurteilung erfolgte wieder mittels MTT-Assay. Im Vergleich zur Monotherapie zeigt die Kombinationstherapie in beiden Zelllinien bessere Ergebnisse im Sinne eines reduzierten Gesamtüberlebens. In den AGS-Zellen: LBH 50 nM / Doxorubicin 0.5  $\mu$ M: 35.34 %  $\pm$  13.44 gegenüber Monotherapie Doxorubicin 0.5  $\mu$ M: 84.46 %  $\pm$  0.53, MKN45-Zellen: LBH100 nM / Doxorubicin 0.5  $\mu$ M: 60.75 %  $\pm$  2.75 gegenüber Monotherapie Doxorubicin 0.5  $\mu$ M: 82.13 %  $\pm$  3.79; siehe Abbildung 30. Unter der Anthrazyklin Monotherapie kann eine signifikante, therapeutische Wirkung hingegen erst in höheren Dosen beobachtet werden. Für die Gruppe der AGS-Zellen wäre unter Kombinationstherapie eine Reduktion der Anthrazyklindosis um die Hälfte von 1  $\mu$ M auf 0,5  $\mu$ M möglich, um einen zur Monotherapie vergleichbaren Erfolg zu erzielen. Die Wirkung der Kombinationstherapie mit der maximalen Doxorubicindosis von 1  $\mu$ M (Gesamtüberleben von 10.11 %  $\pm$  2.35 in den AGS-Zellen) kann im Experiment unter

Monotherapie nicht erreicht werden. Um einen vergleichbaren Behandlungserfolg zu generieren, müsste die Zytostatikadosis gesteigert werden, was eine höhere Toxizität für den Patienten nach sich ziehen würde.

Diese Ergebnisse lassen die Schlussfolgerung zu, dass eine Kombinationstherapie aus LBH589 und Anthrazyklinen zu einem signifikant besseren Therapieansprechen der Tumorzellen im Vergleich zur Monotherapie führt und impliziert neue Behandlungsansätze für die klinische Onkologie.



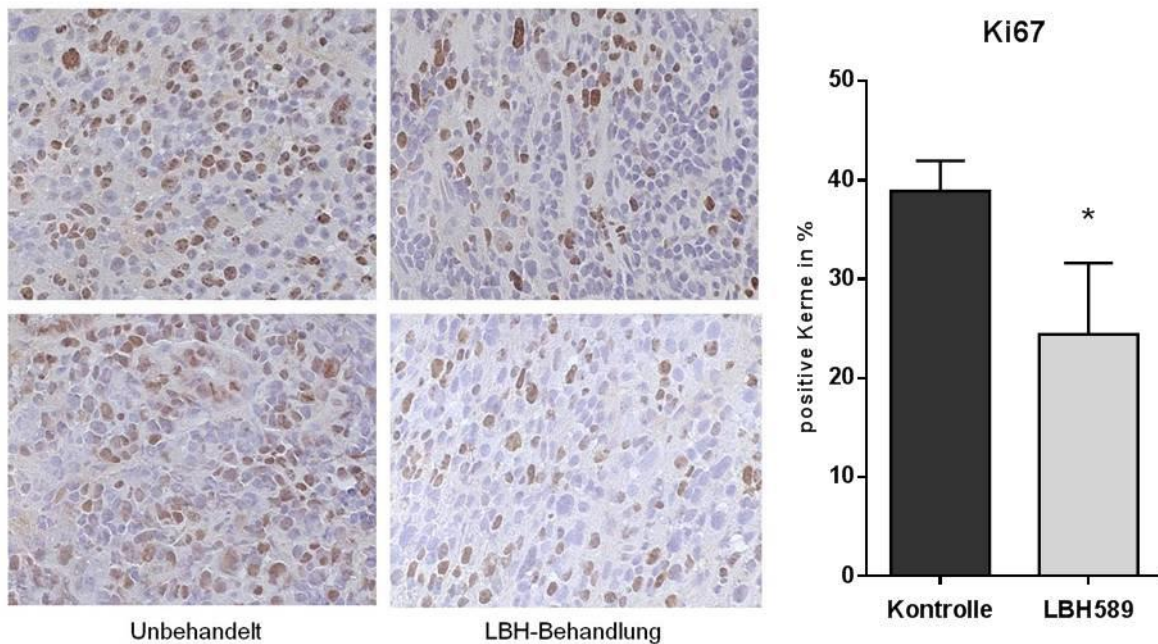
**Abbildung 30:** MTT-Assay; Apoptoseansatz mit 20.000 Zellen / Well. 12-stündige Vorbehandlung mit LBH589 (Konzentrationen jeweils 50 nM für AGS, 100 nM für MKN45-Zellen); im Anschluss 48 h Inkubation mit oben genannten Doxorubicin-Konzentrationen. Vergleichbare Monotherapie wurde jeweilig als Kontrolle durchgeführt  $\pm$  S.D. (n = 3).

## 5.7 LBH-Monotherapie *in vivo*

In den vorangegangenen Kapiteln konnten die unterschiedlichen pharmakologischen Angriffspunkte von LBH589 in zellulären Experimenten gezeigt werden. Danach wirkt LBH589 über die Verringerung der HDAC2 Aktivität und Zunahme der Acetylierung, was eine Verringerung der Tumorpheriferation zur Folge hat. Zudem kommt es unter der Behandlung zur Reaktivierung von Tumorsuppressorgenen und Genen, die zur proteasomalen Degradation von HDAC2 beitragen. Nun gilt es, diese Ergebnisse auf das Mausmodell zu übertragen und auch *in vivo* nachzuweisen, was im folgenden Abschnitt geschehen soll. Die folgenden Ergebnisse wurden in Kooperation mit Regel *et al.* generiert.

Die *CEA/Tag* Mäuse wurden nach dem in 4.7 dargestellten Schema monotherapeutisch mit LBH589 behandelt. Hierbei wurde das Medikament (20 mg/kg / Injektion gelöst in 5 % Dextroselösung) über 14 Tage als intraperitoneale Injektion nach einem 5-days-on, 2-days-off Schema verabreicht und die Tiere zwischen dem 75. und 81. Tag getötet.

Um den Einfluss auf die Tumorpheriferation zu überprüfen, wurde eine immunhistochemische Färbung mit einem Ki67 Antikörper durchgeführt. Ki67 ist ein Proliferationsmarker, welcher in Zellen exprimiert wird, die sich in der Mitose befinden. Die immunhistochemische Färbung zeigt im Tumorgewebe der über 14 Tage mit LBH589 behandelten Gruppe eine signifikante Reduktion der Ki67 Expression um 37,15 %  $\pm$ 7,20 im Vergleich zu unbehandelten *CEA/Tag* Mäusen (Abbildung 31). Repräsentativ sind in Abbildung 31 zudem einige Schnitte aus den Tumorregionen der beiden verglichenen Gruppen gegenübergestellt. Hier ist ebenfalls zu erkennen, dass in den Tumorarealen der unbehandelten Kontrollgruppe eine größere Anzahl der Zellen eine nukleäre Färbung und somit eine höhere Proliferation aufweist. Dies beweist, dass LBH589 auch *in vivo* einen hemmenden Effekt auf die Tumorpheriferation ausübt und somit einen potentiellen antitumoralen Effekt besitzt.



**Abbildung 31:** Immunhistochemische Färbung mit dem Proliferationsmarker Ki67. Es sind jeweils die Tumorregionen der mit LBH589 behandelten Mäuse und die unbehandelte Kontrollgruppe gegenüber gestellt. Auszählung der Ki67 positiven Zellen nach immunhistochemischer Färbung  $\pm$  S.E.;  $n = 8$ , \*  $p \leq 0.05$ ..

### 5.7.1 Kombinationstherapie *in vivo*

Um festzustellen, ob die Kombinationstherapie aus LBH589 und Anthrazyklin-Chemotherapeutika auch *in vivo* einen Effekt auf die Tumorpheriferation hat und der Monotherapie mit konventionellen Chemotherapeutika überlegen ist, bedienen wir uns des CEA/Tag Mausmodells.

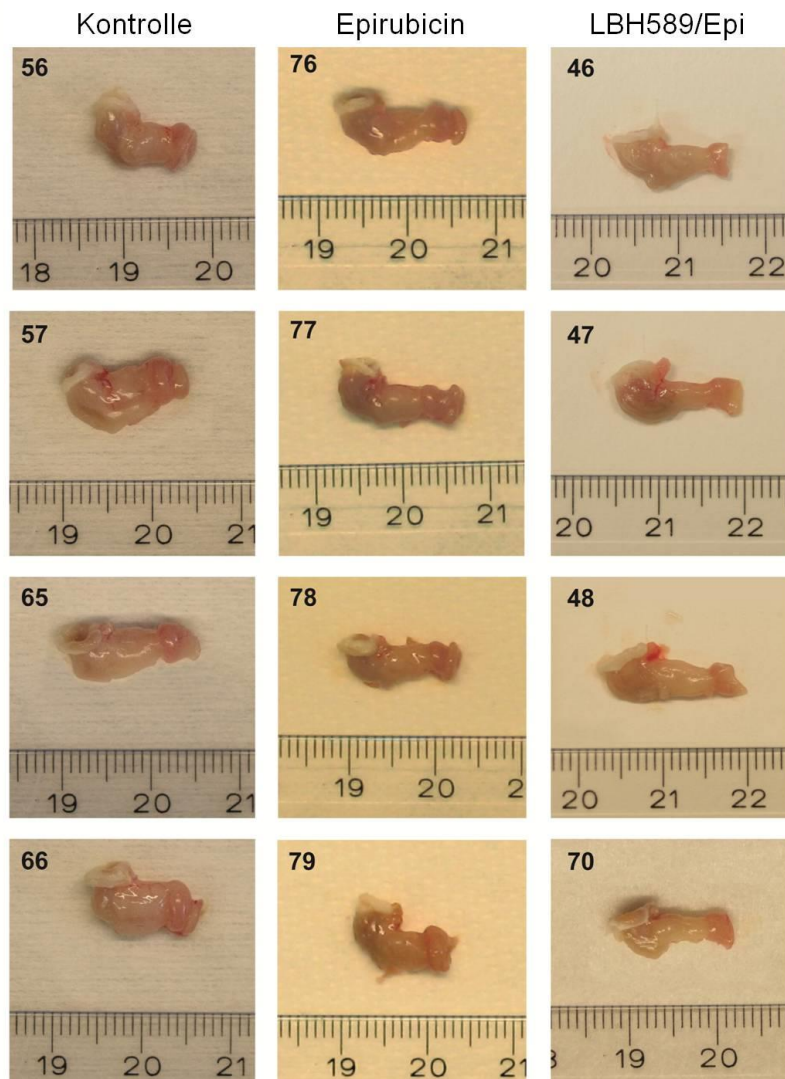
Den Tieren ( $n = 5$ ) wurde für 14 Tage LBH589 (Konzentration 20 mg/kg) und anschließend dreimal 10 mg/ml Epirubicin (entspricht einer Dosis von 3 mg/kg / Injektion) in einem Zeitraum von zehn Tagen injiziert. Schließlich wurde ein zusätzlicher Therapiezyklus mit einer 7-tägigen LBH589 und einer zweimaligen Epirubicin Behandlung während der letzten 7 Tage angeschlossen. Als Kontrollgruppen dienten eine Epirubicin Monotherapie ( $n = 6$ ) sowie eine Gruppe ( $n = 5$ ), die lediglich 200  $\mu$ l physiologische Kochsalzlösung als i.p. Injektion erhielt. Nach 78 bis 83 Tagen wurde der Versuch beendet (siehe auch 4.7).

#### 5.7.1.1 Kombinationstherapie: Tumorstwachstum *in vivo*

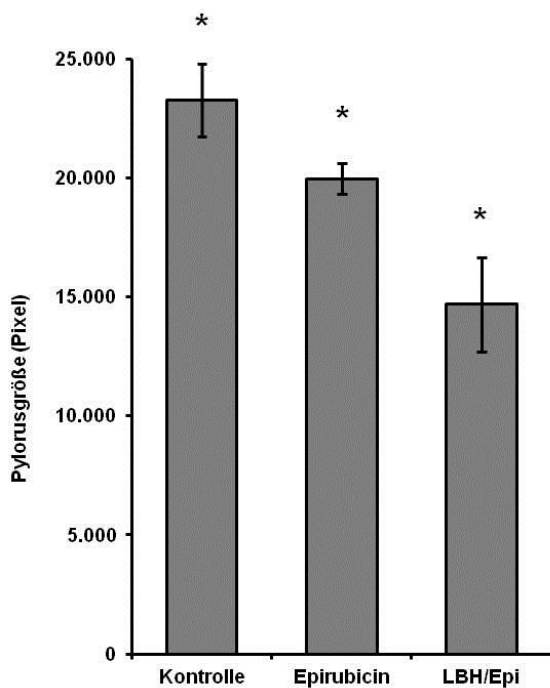
Bereits bei der Präparation der Mägen ergaben sich makroskopisch deutliche Unterschiede zwischen den verschiedenen Therapiegruppen (Abbildung 32). In der Kontrollgruppe wiesen die Mägen die größte Tumorausdehnung, eine massive Verdickung der Wand mit Einengung des Lumens und Pylorusstenose auf. Es imponierte eine derbe, sich über die Pylorusregion hinweg ausdehnende Tumormasse, wohingegen in der Kombinationstherapie-Gruppe ein Tumor weder sicht- noch tastbar war. Eine Zwischenstellung bildete die Gruppe der Epirubicin Monotherapie, bei der sich zwar Tumor erkennen ließ, dieser in seiner Größe und

Ausdehnung jedoch deutlich geringer war als die Neoplasien der Kontrollgruppe und auf den Pylorus beschränkt blieb.

Der makroskopische Eindruck ließ sich auch in der Tumorgößenmessung bestätigen (Abbildung 33): In der Kombinationsgruppe ist, gemessen in Pixeln  $\times 10^4$ , die stärkste Tumorreduktion feststellbar (Kontrollgruppe  $2.46 \times 10^4 \pm 0.21$ , Epirubicin  $1.99 \times 10^4 \pm 0.66$ , Kombinationsgruppe LBH589/Epirubicin  $1.46 \times 10^4 \pm 0.15$ ).

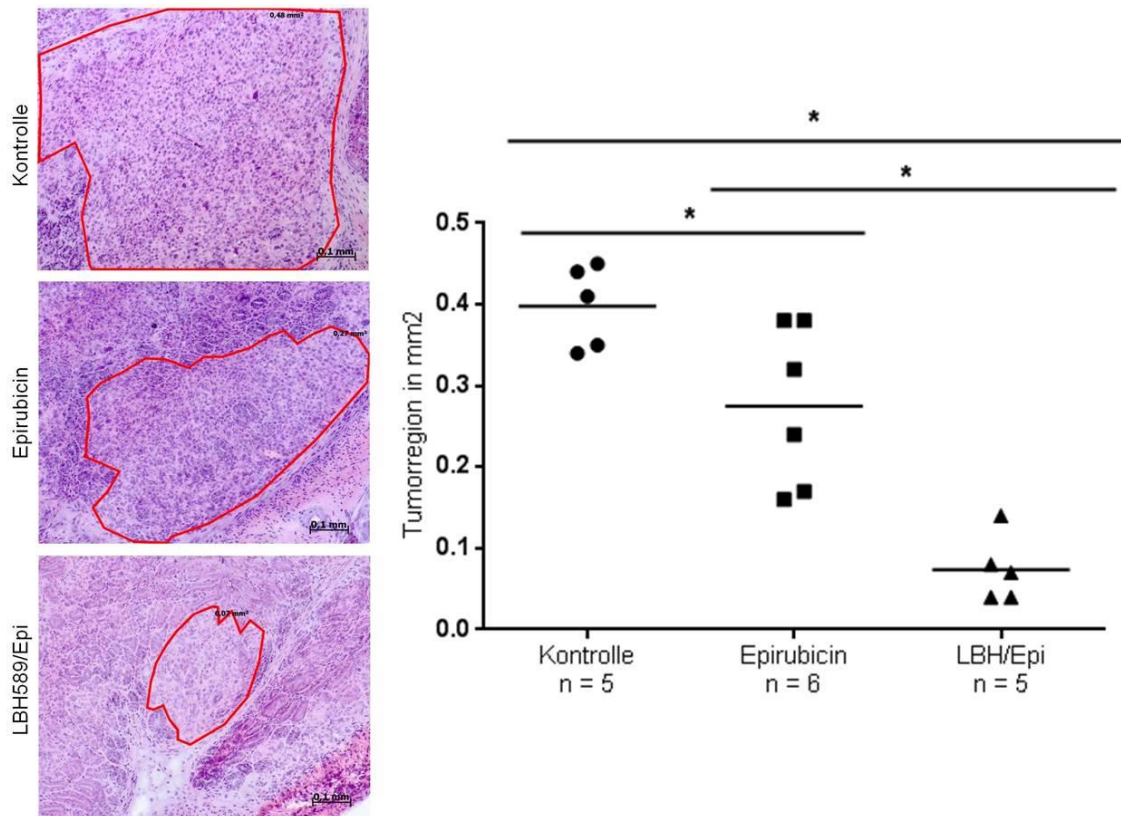


**Abbildung 32:** Makroskopische Beurteilung der posttherapeutischen Tumorgöße in den CEA/Tag Mäusen. Vertretend ist aus jeder Therapiegruppe (Kontrolle, Epirubicin, LBH/Epirubicin) ein makroskopisches Bild gezeigt.



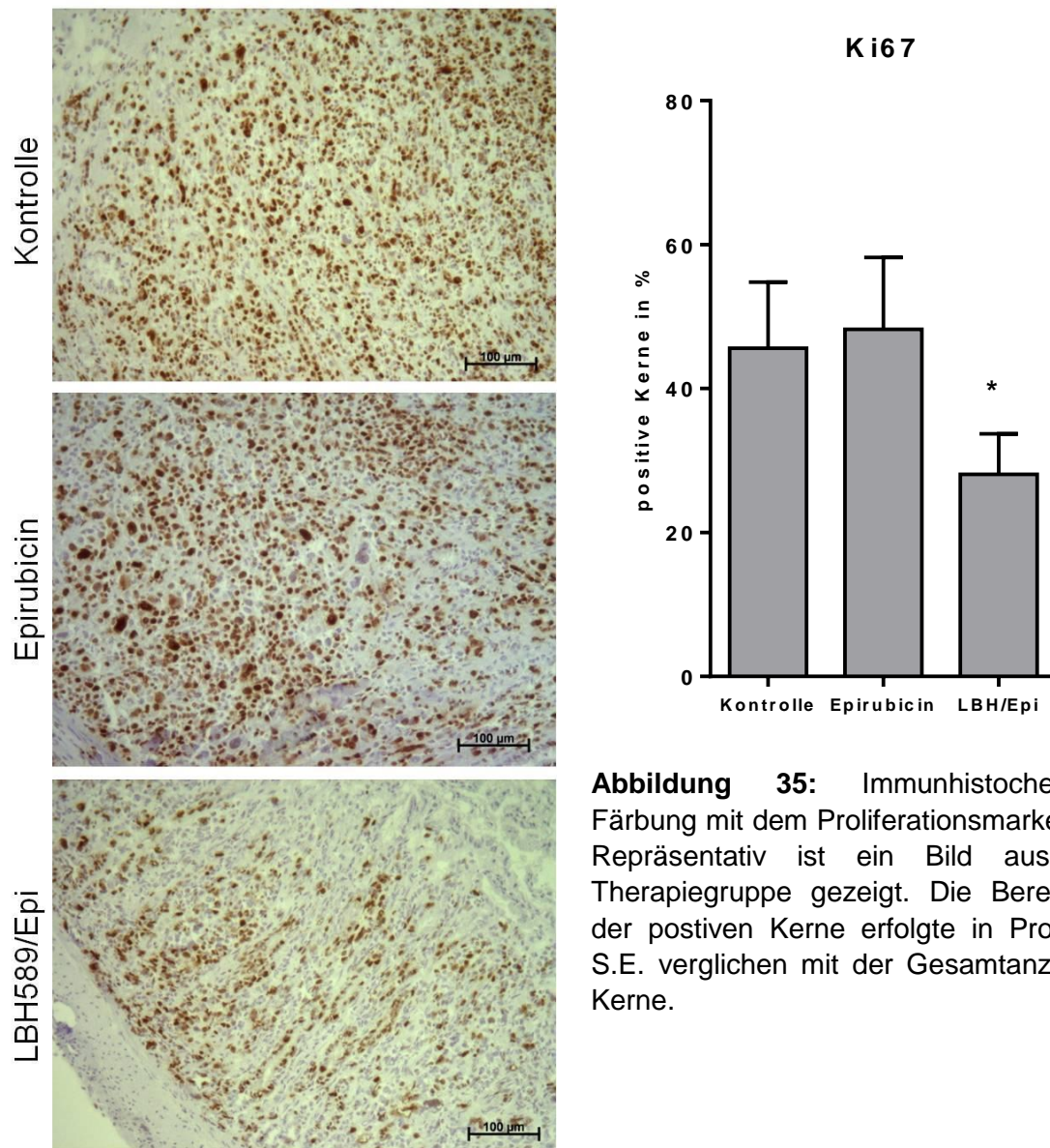
**Abbildung 33:** Makroskopische Beurteilung der posttherapeutischen Tumorgöße in den *CEA/Tag* Mäusen. Abgebildet ist die gemessene Tumorausdehnung in der Pylorusregion in Pixeln x 10<sup>4</sup>. \* p ≤ 0.05.

Nachdem nun die Vorteile der Kombinationstherapie *in vivo* makroskopisch gezeigt sind, gilt es, diese parallel auf histologischer Ebene zu reproduzieren. In Abbildung 34 ist links für jede Therapie-Gruppe jeweils ein histologisches Bild repräsentativ und rechts ein Diagramm abgebildet, welches die Tumorgößen in Abhängigkeit der Therapiegruppe miteinander vergleicht. Es lässt sich nachweisen, dass bei den Mäusen, die mit der Kombinationstherapie behandelt wurden, signifikant kleinere Tumoren gefunden werden (Kontrollgruppe  $0.39 \pm 0.02 \text{ mm}^2$ ; Kombinationstherapie Gruppe mit LBH/Epirubicin,  $0.07 \pm 0.02 \text{ mm}^2$ ). Makroskopisch war eine Unterscheidung zum gesunden Magen kaum noch möglich und auch mikroskopisch bestätigt sich dieser Eindruck in einem deutlich kleineren Tumor. Die Monotherapie mit Epirubicin führte ebenfalls zu einer Reduktion der Tumorgöße, allerdings in geringerem Maße als die Kombinationstherapie (Kontrollgruppe  $0.39 \pm 0.02 \text{ mm}^2$ ; Epirubicin-Gruppe  $0.27 \pm 0.04 \text{ mm}^2$ ), wohingegen die Mägen der mit physiologischer Kochsalzlösung behandelten Kontrollgruppe die größten Tumoren aufwiesen.



**Abbildung 34:** CEA/Tag Mäuse wurden mit Epirubicin Mono- (Epi), sowie kombinationstherapeutisch mit LBH589 und Epirubicin (LBH/Epi) behandelt (Behandlungsprotokoll siehe 4.7) und mit den Vehikel behandelten Kontrollen verglichen (n = 5-6 pro Gruppe). Repräsentative, HE-gefärbte Bilder zum Zwecke der Tumormessung, Vergrößerung x200. Die Tumorgöße wurde in mm<sup>2</sup> in n = 2 Bereichen gemessen, \* p < 0.05.

Analog zur Reduktion der Tumorgöße wurde die Proliferation immunhistochemisch mittels Ki67 Färbung bestimmt, wobei in der Kontrollgruppe durchschnittlich 45.61 % ± 4.58, in der Epirubicin-Gruppe 48.23 % ± 4.99 und in der Kombinationsgruppe 28.1 % ± 2.82 der Tumorzellen eine positive Kernfärbung zeigten (Abbildung 35). Dieses Ergebnis lässt die Schlussfolgerung zu, dass die Tumoren in der kombinationstherapeutisch behandelten Gruppe nicht nur die geringste Größe besaßen, sondern auch am wenigsten proliferierten.



**Abbildung 35:** Immunhistochemische Färbung mit dem Proliferationsmarker Ki67. Repräsentativ ist ein Bild aus jeder Therapiegruppe gezeigt. Die Berechnung der positiven Kerne erfolgte in Prozent  $\pm$  S.E. verglichen mit der Gesamtanzahl der Kerne.

Somit ist bestätigt, dass die Kombinationstherapie aus einer Vorbehandlung mit LBH589 gefolgt von Epirubicin auch *in vivo* eine vielversprechende Therapieoption darstellen könnte.



## 6 Diskussion

Das Magenkarzinom ist auf Grund seiner hohen Therapieresistenz gegenüber konventionellen Zytostatika vor allem in fortgeschrittenen Stadien nur schlecht zu behandeln. Panobinostat (LBH589) stellt einen neuen Pan-HDAC-Inhibitor dar, der eine potente inhibitorische Aktivität gegenüber allen HDAC Klassen bereits in niedrigen nanomolaren Konzentrationen vermittelt. Als Monotherapie zeigt Panobinostat überzeugende Resultate unter anderem in der Behandlung von hämatologischen Systemerkrankungen, wie dem multiplen Myelom, kutanen T-Zell- und Hodgkin-Lymphom, aber auch anderen Tumorentitäten wie dem gastrointestinalen Stromatumor (Floris et al., 2009; Deangelo et al., 2013). Es ist das Ziel dieser Arbeit die Wirksamkeit von LBH589 beim Magenkarzinom zu untersuchen und die molekularen Mechanismen zu beleuchten.

Die Grundlage hierfür bilden die Ergebnisse von Weichert *et al.*, welche bestätigten, dass HDACs im Magenkarzinom überexprimiert und mit einer verschlechterten Gesamtprognose assoziiert sind (Weichert et al., 2008). In der vorliegenden Arbeit wurde initial also untersucht, ob die erhöhte HDAC2 Expression in den vorliegenden Kollektiven reproduzierbar war. Für Magentumorzelllinien und humane Tumorproben konnte eine erhöhte HDAC2 Expression nachgewiesen werden, ebenso für das murine *CEA/Tag* Modell. Zwar wurde bei Letzterem auch in normalen Mukosazellen des Magens eine HDAC2 Expression beobachtet, jedoch deuten Experimente mit Mäusen, die eine selektive Defizienz für bestimmte HDACs besitzen, darauf hin, dass HDAC2 eine wesentliche Rolle bei der Aufrechterhaltung von deren intestinalen Mukosa spielt (Zimmermann et al., 2007). Die proliferierenden Zellen, in denen HDAC2 natürlicherweise vorkommt, könnten somit einen potentiell Tumor-initiiierenden Effekt haben. Gestützt werden diese Beobachtungen von Song *et al.*, die 71 Biopsien von koreanischen Magenkarzinompatienten analysierten und dabei in 62 % eine mittlere bis starke HDAC2 Expression fanden. Auch wiesen deren Ergebnisse auf eine Verbindung zwischen Aggressivität des Tumors und HDAC2 Expression hin, da HDAC2 vor allem in fortgeschrittenen Tumorstadien verstärkt gefunden wurde (Song et al., 2005). In einer Arbeit von Mutze *et al.* wurde bei der prätherapeutischen Untersuchung von 127 Magenkarzinompatienten in 54 %, beziehungsweise in 85 %, eine starke, nukleäre HDAC1 und HDAC2 Expression sowie eine Assoziation zwischen HDAC2-Expression und geringerer Tumordifferenzierung gefunden. Bezüglich Therapieansprechen und Gesamtüberleben konnte jedoch keine signifikante Korrelation erhoben werden. Dies führen die Autoren auf ein mit Weichert *et al.* nicht vergleichbares Patientenkollektiv zurück (Mutze et al., 2010). Die erhöhte Expression von HDAC Klasse I ist neben dem Magenkarzinom für zahlreiche Tumorentitäten, darunter, Kolon-, Prostata- und Mammakarzinom, beschrieben (Halkidou et

al., 2004; Wilson et al., 2006; Weichert, 2009). Oft, aber nicht immer, geht mit dieser ein ungünstiger prognostischer Effekt einher. So werden für das Mammakarzinom sogar positive Auswirkungen auf das Gesamtüberleben bei starker HDAC I Expression postuliert (Zhang et al., 2005).

Aus diesen Überlegungen lässt sich ableiten, dass eine HDAC2 Inhibition im Magenkarzinom einen sinnvollen Therapieansatz darstellt. Wie in der Einleitung bereits erwähnt, liefert die monotherapeutische Verwendung von LBH589 für zahlreiche Karzinomentitäten ermutigende Ergebnisse. Erstmals wurde in der vorliegenden Arbeit die Wirksamkeit im Magenkarzinom evaluiert. Dabei zeigte sich in den *in vitro* Experimenten sowohl eine zeit- als auch eine dosisabhängige Abnahme der Zellviabilität. Außerdem fand sich eine Korrelation zwischen niedriger HDAC2-Expression und einem verminderten Ansprechen auf LBH589. So wiesen die Zellen der MKN45-Reihe ein vergleichsweise schlechteres Ansprechen bei gleichzeitig relativ geringerer HDAC2-Expression in der Western Blot Analyse auf. Im Enzymaktivitätsassay wird die potente, dosisabhängige Wirkung von LBH589 deutlich. Doch ist auch hier, analog zu obiger Beobachtung, bei den MKN45-Zellen die Applikation einer deutlich höheren Dosis für die Erzielung einer mit den AGS-Zellen vergleichbaren HDAC-Supprimierung nötig. Ähnliche Ergebnisse zur HDACi Therapie in Magentumorzellen liefern Mutze *et al.*, die in ihrer Arbeit MKN45, AGS, und KATOIII-Zellen mit SAHA, beziehungsweise VPA behandelten, wobei sich bereits bei geringen Konzentrationen eine Reduktion der Zellviabilität um bis zu 50 % ergab (Mutze et al., 2010).

Für das Pankreaskarzinom, welches ebenfalls für seine Therapieresistenz und konsekutiv schlechte Prognose bekannt ist, konnten unter der Behandlung mit LBH589 gleichermaßen positive Beobachtungen gemacht werden. *In vitro* wurde sowohl eine Inhibition des Zellwachstums als auch eine Apoptoseinduktion in den Tumorzellen und im Xenograft-Mausmodell eine signifikante Reduktion der Tumorgröße gezeigt (Mehdi et al., 2012).

Der Verlust der Acetylierung des H4 Histons ist ein universelles Kennzeichen von humanen Karzinomen und wird in deren Entwicklung bereits früh beobachtet (Fraga et al., 2005). In der vorliegenden Arbeit konnte eine Re-Acetylierung unter LBH589-Therapie sowohl in Magentumorzelllinien als auch in mononukleären Zellen des peripheren Blutes (PBMCs) bestätigt werden. Der Acetylierungsstatus der Tumorzellen dient dabei als Kontrolle für *in vitro* Analysen, wohingegen der Acetylierungsstatus der PBMCs als Read-out-Marker für LBH589-vermittelte Therapien gilt und der momentan am häufigsten verwendete Biomarker bei der HDACi Therapie ist (Stimson et al., 2009). Dabei fungieren PBMCs als Ersatzmaß für die Acetylierung im Tumor, so dass auf invasive Maßnahmen verzichtet werden kann. In zahlreichen Studien wurde eine zeit- und dosisabhängige Induktion bereits kurz nach Medikamentenapplikation gemessen (Plumb et al., 2003). Korrelierend weist die vorliegende Arbeit in den Magentumorzelllinien auf Proteinebene ebenfalls eine Zeit- und

Dosisabhängigkeit von LBH589 auf die Acetylierung der Histone nach. Insofern schien es sinnvoll, die Acetylierung von PBMCs nach *in vitro* LBH589 Behandlung zu untersuchen. Dabei zeigte sich ein zeitabhängiger Anstieg, der eine Verwendung als Biomarker für Patienten unter LBH589 Behandlung rational erscheinen lässt. Diese Beobachtung wird auch durch Marchion *et al.* gestützt. In der Arbeit wurden PBMCs von Patienten, die an verschiedenen soliden Tumoren litten und mit VPA behandelt wurden, analysiert. Dabei konnte eine Korrelation zwischen der Expression von HDAC2 in PBMCs und dem Level der Histonacetylierung belegt werden. (Marchion *et al.*, 2009). Nichtsdestotrotz bleibt es unklar, ob die Akkumulierung acetylierter Histone in PBMCs einen Rückschluss auf das Ansprechen des Tumors zulässt und sich somit als Marker für die therapeutische Effizienz eignet (Steele *et al.*, 2008; Marks *et al.*, 2009). Kelly *et al.* beispielsweise beobachteten in ihrer Arbeit mit dem HDACi SAHA eine Akkumulierung acetylierter Histone sowohl im peripheren Blut als auch im Tumor bereits für Konzentrationen, die weit unter der effektiven therapeutischen Dosis lagen (Kelly, 2001). Die Rolle von PBMCs als Biomarker bleibt also umstritten und es sollte Gegenstand zukünftiger Forschung sein, inwieweit diese als Indikator für das Erreichen biologisch aktiver Medikamentenlevel dienen können.

Nachdem in der vorliegenden Arbeit der Wirksamkeitsnachweis für LBH589 *in vitro* erbracht war, ergab sich im Folgenden die Frage nach den molekularen und mechanistischen Grundlagen der beobachteten Ergebnisse. Ein häufiger Mechanismus, der zu Tumorentstehung und -progression beiträgt, ist das Ausschalten von sogenannten Tumorsuppressorgenen, zu denen unter anderem *CDKN1A*, auch bekannt als p21, gehört (Huang *et al.*, 2005). Dieser Vorgang stellt gleichsam den Wendepunkt in der Karzinogenese dar, in dessen Folge es zu einem Ungleichgewicht zwischen Onkogenen und Tumorsuppressorgenen und zu unkontrolliertem Zellwachstum mit Tumorproliferation kommt (Hudler, 2012). Zwar betrifft dies multiple Tumorentitäten und ist keineswegs spezifisch für Magenkarzinome, dennoch sind derartige Veränderungen für bis zu 84 % dieser Tumoren beschrieben (Grabsch *et al.*, 2004; Ottini *et al.*, 2006). Es wird angenommen, dass im Rahmen der Karzinogenese eine epigenetische Stilllegung von p21 durch Modifikation von Histonen erfolgt (Fraga *et al.*, 2005). Diese Annahme gründet sich auf Experimente, in denen eine globale Hypoacetylierung des *CDKN1A*-Promotors beobachtet wurde, welche mit einer transkriptionellen Stilllegung des Gens einherging. Außerdem konnte in der *CDKN1A*-Promotorregion eine Hypoacetylierung in Leukämie-Tumorzellen, jedoch kein veränderter Acetylierungsstatus in normalen Zellen, nachgewiesen werden (Archer *et al.*, 1998; Richon *et al.*, 2000). Ein potentieller Wirkmechanismus, der für nahezu alle HDAC-Inhibitoren beschrieben wurde, ist die p53-unabhängige Reaktivierung des p21 Tumorsuppressorgens. In der Folge kommt es zum induzierten G1-Zellzyklus-Arrest und konsekutiv zur Apoptose (Sandor *et al.*, 2000).

Auch in dieser Arbeit konnte bei den mit LBH589 behandelten Magenkarzinomzellen ein dosisabhängiger Anstieg der p21 mRNA Expression nachgewiesen werden. Analog beobachteten Arts *et al.* eine dosisabhängige Reaktivierung von p21 bei Xenograft-Mäusen mit Ovarialkarzinom, die mit R306465, einem Klasse I HDACi, behandelt wurden. (Arts et al., 2007). Zusätzlich gestützt wird das Ergebnis von Lee *et al.*, die in ihrer Arbeit Magentumorzellen mit Trichostatin A inkubierten und mittels Microarray-Analyse eine Hochregulation von p21 fanden (Lee et al., 2004). Weiterhin konnte auch für Pankreaskarzinomzellen unter LBH589 Behandlung eine gesteigerte p21 Expression, die Akkumulation hyperacetylierter H4 Histone sowie ein Zellzyklusarrest detektiert werden (Haefner et al., 2008). Es wird vermutet, dass diesem Induktionsmechanismus eine direkte Interaktion zwischen HDACi und *CDKN1A*-Promotor ohne dazwischen geschaltete Elemente zugrunde liegt. So wurde von Richon *et al.* unter SAHA Therapie eine Akkumulation acetylierter Histone im Bereich des mit dem *CDKN1A* Gen assoziierten Chromatins und korrelierend ein Anstieg von dessen Transkription beobachtet (Richon et al., 2000). In einer weiteren Arbeit wurde außerdem die direkte Rolle von HDAC2 als p21-Repressor in embryonalen F9 Tumorzellen untersucht und es konnte nach dem Knockout von HDAC2 eine signifikante Induktion von p21 beobachtet werden (Jurkin et al., 2011). Letztendlich kann durch die Erkenntnisse auf eine direkte Regulation von p21 durch Histonacetylierung im Promoterbereich des Gens geschlossen werden. HDAC-Inhibitoren sind somit ein geeignetes Mittel, um epigenetisch stillgelegte Tumorsuppressorgene wie p21 zu re-exprimieren.

Neben der Reaktivierung von Tumorsuppressorgenen stellt die Proteindegradation einen entscheidenden Wirkungsmechanismus von HDACi dar und wurde dieser Arbeit erstmals für das Magenkarzinom untersucht. Mittels Western Blot wurde die zeitabhängige Degradation von HDAC2 unter LBH589 auf der Proteinebene nachgewiesen und somit der entsprechende Wirkungsnachweis erbracht.

Wie bereits ausführlich diskutiert, ist die HDAC2-Überexpression an der Entstehung neoplastischer Krankheiten beteiligt. Die Degradation von HDAC2 sollte folglich zur Hyperacetylierung der Histone führen und somit zur Apoptose-Initiierung und Hemmung des Tumorwachstums beitragen, was so in mehreren Arbeiten gezeigt werden konnte (Zhu et al., 2004; Huang et al., 2005; Fritsche et al., 2009). An der Ubiquitylierung und proteasomalen Degradation von HDAC2 ist eine hierarchische Kaskade mehrerer Enzyme beteiligt (Kramer, 2009). Die Ubiquitin-Ligase RLIM ist ein spezifischer HDAC2 Regulator und kann einen limitierenden Faktor bei dessen Degradation darstellen (Bach et al., 1999; Kramer et al., 2003; Buchwald et al., 2009). Neben RLIM spielt das *Ret Finger-Protein-like 4* (RFPL4), eine Rolle bei der Proteindegradation. Im Microarray von LBH589 behandelten AGS Zellen fiel RFPL4 mit einer 125-fachen Überexpression auf und stellte damit das am stärksten

hochregulierte Gen im Array dar. Wenig ist bekannt über dieses Protein, das bisher nur in Keimzellen von Mäusen und Hamstern untersucht wurde; man vermutet jedoch, dass es als E3-Ubiquitin-Ligase am proteasomalen Proteinabbau beteiligt ist und als solches den letzten Schritt der Ubiquitylierung katalysiert (Rajkovic et al., 2002; Suzumori et al., 2003). In dieser Arbeit konnte erstmalig für das Magenkarzinom gezeigt werden, dass es unter LBH589 Therapie zu einer Induktion von RLIM und RFPL4 kommt. Dies bietet einen möglichen Erklärungsansatz für die Degradation von HDAC2 und den Wirkungsmechanismus von LBH589. Unsere Ergebnisse zeigten auf RNA-Ebene für *RFPL4*, nicht jedoch für *RLIM*, einen dosisabhängigen Anstieg der Expression nach LBH589 Behandlung wohingegen auf Proteinebene für RLIM eine zeitabhängige Zunahme beobachtet wurde. Damit konnte für die LBH589 Behandlung nachgewiesen werden, dass die HDAC Proteindegradation als ein Wirkungsmechanismus zugrunde liegt.

In einer der wenigen Publikation zu diesem Thema wurde zuvor dargestellt, dass es unter Valproat-Therapie zu einer Degradation von HDAC2 kam, obwohl die Proteinexpression von RLIM konstant blieb. Die Wissenschaftler erklären dies mit der Induktion von Ubc8 als bestimmendem Faktor. Bei Trichostatin A stellten die Autoren dagegen eine Verringerung der Proteinlevel von RLIM und folglich keine HDAC2 Degradation fest. Auf RNA-Ebene führte keiner der beiden HDACi zu Veränderungen der RLIM Expression (Kramer et al., 2003). Auf Grund der wenigen Erkenntnisse, die bezüglich dieser molekularen Grundlagen der HDAC2 Degradation bisher vorliegen, wird es Gegenstand zukünftiger Forschung sein müssen, weiteres Verständnis zu erlangen.

Da LBH589 ein Pan-Histondeacetylaseinhibitor ist, sollte die spezifische Stilllegung von HDAC1 und HDAC2 in den Tumorzellen untersucht werden: insbesondere deren Proliferations- und Apoptoseverhalten, aber auch die Sensitivität gegenüber klassischen Chemotherapeutika, um eventuell neue epigenetische Therapiemodelle zu analysieren.

Dass eine aberrante Expression von Klasse I HDACs und im Speziellen von HDAC2 eine Rolle bei Proliferation und Karzinogenese spielt, wurde in dieser Arbeit ausführlich erklärt. Im Umkehrschluss ergibt sich daraus die Frage, inwieweit sich ein Knockdown dieser Enzyme auf Wachstumsverhalten und Apoptose auswirkt. In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die transiente Transfektion von AGS-Zellen mit siRNA gegen HDAC2 zu einer verminderten Proliferation unbehandelter Zellen und zu einer Sensibilisierung gegenüber Doxorubicin führt. Dabei waren die Resultate für die Transfektion mit beiden siRNAs gegen HDAC1 und HDAC2 und gegen siHDAC2 allein vergleichbar im Hinblick auf die verminderte Proliferation. Die Transfektion mit siHDAC1 erbrachte hingegen keine Hemmung des Zellwachstums. Ganz ähnliche Ergebnisse publizierten Dejligbjerg *et al.*. In HeLa-Zellen wiesen sie in HDAC depletierten Zellen einen antiproliferativen Effekt nach, der ebenfalls für den gemeinsamen Knockdown von HDAC1 und 2 am größten war (Dejligbjerg et al., 2008).

Glaser *et al.* fanden in ihrer Arbeit eine konzentrationsabhängige Proliferationshemmung in siHDAC1-transfizierten HeLa-Zellen, wobei das Verhalten von siHDAC2-transfizierten Zellen wegen des unzureichenden Knockdowns nicht untersucht werden konnte. Neben der verminderten Proliferation beobachteten die Wissenschaftler um Glaser *et al.* auch signifikante morphologische Veränderungen der Zellen sowie eine Hyperacetylierung in siHDAC3 HeLa-Zellen. Beachtenswert erscheint hier auch die Tatsache, dass ein Knockdown von HDACs der Klasse II HDAC 4 und 7 keinerlei derartige Effekte zeigte, was wiederum die besondere Rolle von Klasse I HDACs bei Proliferation und Überleben von Tumorzellen unterstreicht (Glaser *et al.*, 2003). In einer anderen Arbeit wiesen Weichert *et al.* in Kolonkarzinomzellen eine Verminderung der Proliferation sowohl für HDAC1- als auch für HDAC2-depletierte Zellen nach (Weichert *et al.*, 2008). Im Gegensatz dazu konnten Senese *et al.* in Osteosarkom- und Mammakarzinomzellen nur beim Knockdown von HDAC1, nicht aber bei HDAC2, eine verringerte Proliferation beobachten (Senese *et al.*, 2007). Dieses zur übrigen Literatur diskrepante Ergebnis führen die Autoren auf die unterschiedlichen HDAC-Expressionsprofile der verwendeten Tumorzelllinien zurück. Da diese Expressionsmuster zwischen den verschiedenen Zelllinien variieren, können die Reaktionen auf einen spezifischen Knockdown dementsprechend unterschiedlich ausfallen.

Dass eine verminderte Expression von HDAC1 und HDAC2 in Tumorzellen neben einer verringerten Proliferation auch zu einem reduzierten Gesamtüberleben im Apoptoseansatz führt, ist in dieser Arbeit gezeigt. Der Einfluss ist hier sogar größer als bei der Proliferation, wobei sich zwischen siHDAC1 und 2 kein Unterschied im Gesamtüberleben ergibt. Es liegt also die Vermutung nahe, dass ein Knockdown der beiden HDAC Isoformen Apoptose verursachen kann. Diese Überlegung stützen Ergebnisse von Glaser *et al.*, die in HeLa-Zellen eine konzentrationsabhängige Apoptose nach Transfektion mit siHDAC3 beobachteten (Glaser *et al.*, 2003). Für HDAC2 belegten Zhu *et al.* ebenfalls eine Induktion von Apoptose in Kolonkarzinomzellen, nachdem diese mit siRNA gegen HDAC2 behandelt worden waren (Zhu *et al.*, 2004).

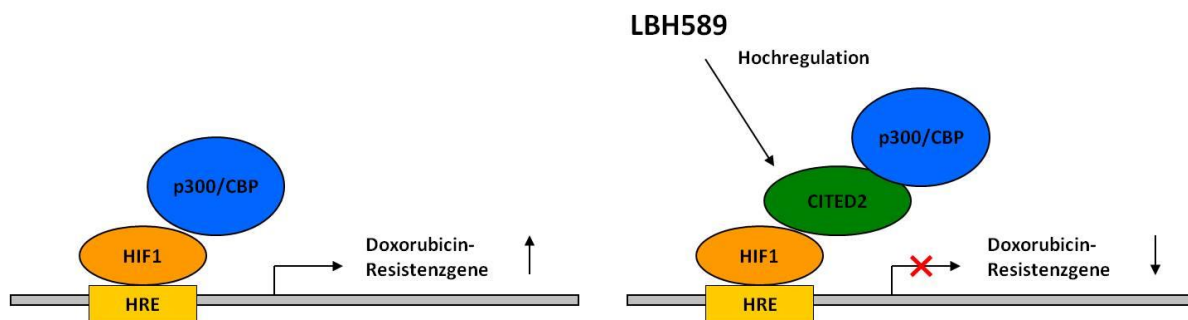
Immer wieder kommt die Frage nach der redundanten Funktion von HDACs untereinander auf. Es existieren zwischen HDAC1 und HDAC2 wechselseitig ersetzbare Funktionen. So führt beispielsweise die Deletion von HDAC2 zu einer Hochregulation von HDAC1 *et vice versa* (Lagger *et al.*, 2002; Zimmermann *et al.*, 2007). In vielen Funktionen kann die Inaktivierung eines der beiden Klasse I HDACs durch das jeweils andere Enzym kompensiert werden. So führen selektive Knockouts in Herz-, Glia-, B-Zellen oder Neuronen nicht zu offensichtlichen Schäden; die kombinierte Depletion von HDAC1 und 2 dagegen zu deutlichen Defekten, was auf eine redundante Funktion in diesen speziellen Zelltypen hinweist (Jurkin *et al.*, 2011). Dennoch kann beispielsweise eine komplette Deletion von

HDAC1 in der murinen Embryogenese nicht kompensiert werden und resultiert in einen frühen, letalen Phänotyp (Lagger et al., 2002).

Der letzte zu diskutierende Aspekt im Hinblick auf den spezifischen HDAC-Knockdown ist sein Einfluss auf die Chemoresistenz. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit lassen den Schluss zu, dass mit siHDAC2 transfizierte Tumorzellen eine erhöhte Sensitivität gegenüber dem klassischen Chemotherapeutikum Doxorubicin aufweisen. Für das Mammakarzinom bestätigten Marchion *et al.* das Analoge; auch sie fanden in siHDAC2, nicht aber in siHDAC1, transfizierten Zellen eine gesteigerte Apoptoserate unter der Behandlung mit Epirubicin. Dabei scheint HDAC2 auch direkten Einfluss auf die Chromatinplastizität zu haben. In elektronenmikroskopischen Analysen konnte die Arbeitsgruppe in HDAC2-, nicht aber mit HDAC1-, Knockout-Mammakarzinomzellen eine Chromatindekondensation nachweisen. Außerdem wurde per Microarray-Analyse in HDAC2 depletierten Zellen eine Herunterregulation von Genen, welche die Chromatinkonformation beeinflussen, gefunden (Marchion et al., 2009). Einen anderen Erklärungsansatz liefern Fritsche *et al.*, die herausfanden, dass HDAC2 im Gegensatz zu HDAC1 über eine negative Regulation des pro-apoptischen NOXA-Proteins zur Therapieresistenz gegenüber dem Topoisomerase II Inhibitor Etoposid in duktalem Pankreastumorzellen (PDAC) führt (Fritsche et al., 2009). Wie entscheidend die einzelnen Regulationsmechanismen sind und welcher letztendlich am meisten zu der auch in der vorliegenden Arbeit gezeigten Verbesserung der Chemosensibilität beiträgt, wird Gegenstand weiterer Forschung sein. In jedem Fall lässt sich festhalten, dass eine reduzierte HDAC2 Expression zu einer verminderten Resistenz gegenüber Anthrazyklin-Chemotherapeutika führen und somit einen Ansatzpunkt bei der Bekämpfung der *Multidrugresistance* darstellen kann.

Fundierte wissenschaftliche Erkenntnisse erfordern stets eine Prüfung der Verhältnisse *in vivo*. In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals die antitumorale Wirkung von LBH589 im Mausmodell des Magenkarzinoms gezeigt werden. Im monotherapeutischen Vorversuch wurde dabei bereits initial immunhistochemisch eine Verringerung der Proliferation mittels Ki67 nachgewiesen. Für solide Tumoren liegen bisher überwiegend Erfolgsnachweise im subkutanen Xenograft-Nacktmausmodell zum Beispiel für das Pankreas- (PDAC), Gallenblasen-, und Gallengangskarzinom, für das hepatozelluläre und das anaplastische Schilddrüsenkarzinom sowie für gastrointestinale Stromatumoren vor (Bluethner et al., 2007; Floris et al., 2009; Di Fazio et al., 2010; Catalano et al., 2012; Mehdi et al., 2012). Nachteil dieser Modelle ist die unzureichende Übertragbarkeit auf die humane Situation wegen des modulierten Immunsystems und der subkutanen Tumorlokalisation. Plausible murine *in situ* Modelle existieren lediglich für das Lungen- und Mammakarzinom (Crisanti et al., 2009; Tate et al., 2012). Wie zu Beginn der Diskussion dargelegt, zeigt LBH589 in der Behandlung von Patienten mit hämatologischen Systemerkrankungen bereits heutzutage ermutigende

Ergebnisse. In der Monotherapie solider Tumoren sind die beobachteten Effekte doch häufig noch inkonsistent und in Teilen unbefriedigend und insuffizient (Bolden et al., 2006). Es besteht also dringender Bedarf an wirksameren Therapiestrategien, welche mit der Kombinationstherapie gefunden wurden. Die von Regel, Merkl *et al.* erstmals beschriebene Sensibilisierung von Magenkrebszellen gegenüber Anthrazyklinen nach LBH589-Behandlung bietet eine gänzlich neue Rationale für diese Therapieform (Regel et al., 2012). In unserer Publikation konnten wir zeigen, dass LBH589 zu einer verminderten Expression von Doxorubicin-Resistenzgenen führt. Durch Promotoranalysen wurde das Gen *CITED2* als möglicher Mediator gefunden, welches durch HDAC Inhibierung re-exprimiert werden kann und für die Inhibition von angeschalteten Resistenzgenen verantwortlich ist. Somit wurde in Luciferase-Reporter Assays gezeigt, dass die Re-Expression von *CITED2* die Supprimierung von Doxorubicin-Resistenzgenen induziert. Darüber hinaus besitzt *CITED2* eine bedeutende klinische Relevanz. In der Arbeit von Regel *et al.* wurde eine Korrelation zwischen dem *CITED2* Level im humanen Tumor und dem Ansprechen auf Epirubicin gefunden. So wiesen Patienten mit einem positiven Ansprechen (*complete response*) auf die Chemotherapie höhere *CITED2* Level auf, was eine Bedeutung als potentieller Biomarker impliziert.



**Abbildung 36:** Regulation von *CITED2* durch LBH589. Mit der Promotoranalyse konnten *Hypoxia Response Elements (HREs)* in den Doxorubicinresistenzgenen identifiziert werden. In der Folge bindet HIF1 $\alpha$  an HRE und es kommt zur Inhibition der Aktivierung des Coaktivators p300 durch *CITED2*. Durch diesen Mechanismus unterbindet *CITED2* die Transkription von Resistenzgenen. Abbildung modifiziert nach (Bhattacharya et al., 2003) und (Regel et al., 2012).

Diese Ergebnisse sind von außerordentlicher klinischer Bedeutung. Epirubicin wird in den Schemata zur chemotherapeutischen Behandlung des Magenkarzinoms sowohl perioperativ als auch in fortgeschrittenen Stadien verwendet (Cunningham et al., 2006; Moehler et al., 2011). Es inhibiert die DNA Replikation indem es an die Topoisomerase II $\alpha$  als Schlüsselenzym der Zellteilung bindet. Zudem interkalieren Anthrazykline in die DNA und können durch freie Radikale Doppelstrangbrüche erzeugen (Cortes-Funes et al., 2007). In der vorliegenden Arbeit konnte erstmalig sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine Überlegenheit der Kombinationstherapie aus epigenetischen Therapeutika und klassischen Chemotherapeutika für das Magenkarzinom gezeigt werden. In Zellexperimenten wurde eine höhere Wirksamkeit der klassischen Chemotherapeutika bei verhältnismäßig geringen



Konzentrationen beobachtet, wenn die Tumorzellen zuvor mit der epigenetischen Substanz LBH589 behandelt wurden. Die Tumoren im Mausmodell wiesen bei der Kombinationsbehandlung im Vergleich zur Behandlung mit dem klassischen Chemotherapeutikum sowohl makroskopisch als auch mikroskopisch eine signifikant reduzierte Größe und Abnahme des Proliferationsmarkers Ki67 auf.

Neben der Supprimierung von Resistenzgenen, vermittelt über die epigenetisch-regulierte Re-Expression von CITED2, gibt es zahlreiche andere Erklärungen für die Überlegenheit der Kombinationstherapie gegenüber den monotherapeutischen Ansätzen. Sehr häufig wird postuliert, dass die Dekondensation des Chromatins als Folge der Histon-Hyperacetylierung die Zugänglichkeit der DNA für das schädigende Agens erleichtert (Kim et al., 2003; Marchion et al., 2009). Damit erklärt sich auch das sequentielle Therapieregime: Durch die Vorbehandlung mit dem HDACi kommt es zur Relaxation des Chromatins und die DNA wird angreifbarer für das im Anschluss verabreichte Chemotherapeutikum. Es sind zahlreiche Arbeiten publiziert, in denen ebenfalls eine Kombinationstherapie aus HDAC-Inhibitor und Anthrazyklinen verwendet wird, unter anderem für zahlreiche solide Tumoren, wie Osteosarkom, Mamma-, Pankreas-, Prostata-, Cervix-, Ovarial-, Lungenkarzinom, multiples Myelom und hämatologische Systemerkrankungen, wie die akute, myeloische Leukämie (Munster et al., 2007; Maiso et al., 2009; Munster et al., 2009; Budman et al., 2011; Wittenburg et al., 2011). Interessant bei letzterer Arbeit sind Experimente, in denen humane Leukämiezellen erkrankter Patienten verwendet wurden. Es konnte gezeigt werden, dass es unter der Kombinationstherapie zu einem signifikanten Anstieg apoptotischer Blasten kam, welcher der Monotherapie jeweils überlegen war. Bei den normalen Lymphozyten wurde hingegen keine Änderung der Apoptose festgestellt, was einen weiteren Hinweis auf die selektive Krebszellzytotoxizität dieser Kombinationstherapie liefert. Auch wurde in dieser Arbeit postuliert, dass es keinen signifikanten Unterschied zwischen sequentieller und simultaner Applikation von LBH589 und Doxorubicin gibt (Maiso et al., 2009). Demgegenüber stehen die Ergebnisse von Kim *et al.*, die in ihrer Arbeit verschiedene Tumorzellen, unter anderem Glioblastom- und Kolonkarzinomzellen, mit HDAC-Inhibitoren und Doxorubicin behandelten. Dabei konnte in der genannten Reihenfolge eine signifikant bessere Therapieeffizienz, in umgekehrter Weise hingegen kein verbessertes Ansprechen beobachtet werden. Als Erklärung wird ebenfalls die dekondensierte Chromatinstruktur in Folge der Re-Acetylierung durch die HDACi und konsekutiv verbesserte Zugänglichkeit der DNA für Topoisomerase-Inhibitoren angeführt (Kim et al., 2003). In einer weiteren Arbeit erklären Tsai *et al.* die erhöhte Wirksamkeit dagegen mit einer direkten Interaktion zwischen DNA-Topoisomerase II und den Histondeacetylasen, wobei in diesem Fall die Reihenfolge der Reagenzienapplikation keine Rolle spielen dürfte (Tsai et al., 2000). Einen gänzlich anderen Ansatz liefern Maiso *et al.*, die in ihrer Arbeit eine verstärkte Phosphorylierung von H2A.X, einem Marker für das Ausmaß von DNA-Schädigung, unter Kombinationstherapie

beobachteten. Da dieser Anstieg unter Monotherapie nicht zu beobachten war, vermuten die Wissenschaftler eine verstärkte Induktion von DNA-Doppelstrangbrüchen und Deregulation von Proteinen, die am DNA-Reparatursystem beteiligt sind. Die Gruppe konnte außerdem zeigen, dass die Kombinationstherapie ein spezifisches Genexpressionsprofil bedingt und nicht lediglich die Summe der unter Monotherapie veränderten Gene abbildet. Dabei fanden sich vor allem die Gene der Apoptose und des Zellzyklus verändert (Maison et al., 2009). Für die klinische Implikation scheint die sequentielle Therapie jedoch auch auf Grund des geringeren, kumulativen Toxizitätsprofils die geeignetere zu sein.

Für das Magenkarzinom liegen bisher nur wenige Daten bezüglich einer Kombinationstherapie vor. So zeigten Mutze *et al.* eine synergistische Wirkung von SAHA, beziehungsweise VPA und Cisplatin *in vitro*, *in vivo* Analysen oder Experimente zu mechanistischen Grundlagen fehlen in dieser Arbeit jedoch (Mutze et al., 2010). Zusammengefasst stellt die Kombinationstherapie aus LBH589 und Anthrazyklinen ein aussichtsreiches Modell für die zukünftige Behandlung des Magenkarzinoms dar. Die offensichtlichen Vorteile liegen in einer effektiveren Wirksamkeit und einem verbesserten Toxizitätsprofil für die Patienten, welches sich auf mehrere Aspekte gründet: Die Möglichkeit der sequentiellen Applikation, die spezifische Antitumorzellwirkung sowie die Möglichkeit der Dosisreduktion bei gleicher Effektivität.

Nachfolgend sollen Limitation und das zukünftige Potential dieser Arbeit diskutiert werden. Wichtige Erkenntnisse, die dringend noch gewonnen werden müssen, liegen sicherlich primär in den *in vivo* Experimenten. Zum einen sollten weitere Experimente bezüglich molekularer Mechanismen, die *in vitro* bereits beleuchtet wurden, im Tiermodell bestätigt werden. Dazu gehören vor allem Wirkungsgrundlagen, wie die Reaktivierung von p21 und die Proteindegradation von HDAC2 mittels RLIM und RFPL4. Der wichtigste Aspekt sind jedoch zweifellos Analysen bezüglich des Langzeitüberlebens von Mäusen unter Therapie. Hierbei gilt es zum einen die Toxizität genauer zu beobachten und zum anderen den Effektivitätsunterschied zwischen Mono- und Kombinationstherapie zu präzisieren sowie den Vorteil der Kombinationstherapie zu quantifizieren.

In klinischen Studien sollte die Untersuchung der PBMCs auf Patienten unter laufender Therapie ausgeweitet werden anstatt PBMCs gesunder Probanden erst *in vitro* mit LBH589 zu behandeln, um so einen besseren Einblick in die Pharmakokinetik und -dynamik unter Therapiebedingungen zu erhalten und die Validierung von Biomarkern voranzutreiben. Eine Korrelation zwischen Acetylierungsmuster und Therapieansprechen wäre ebenso sinnvoll.

In der vorliegenden Arbeit konnte die therapeutische Wirkung von Panobinostat im Magenkarzinom und überlegene Effizienz der Kombinationstherapie gezeigt werden. Angesichts der pleiotropischen Effekte, die HDACi vermitteln, ist es von eminenter

Wichtigkeit die zugrunde liegenden molekularen Prozesse zu ergründen. Vor allem auf dem Gebiet der Proteindegradation und der Regulation von Resistenzgenen liegen bisher kaum Erkenntnisse vor. Die gewonnenen Informationen könnten bei der zukünftigen Konzeption sinnvoller Kombinationstherapien helfen. Mit dem Wissen über die zugrunde liegenden Prozesse ergibt sich auch die Möglichkeit der Erforschung von Biomarkern, welche ein Therapieansprechen vorauszusagen vermögen. So sollte CITED2 als potentieller Biomarker bei Patienten unter Therapie gemessen werden. Außerdem stellt sich die Frage, ob eine hohe HDAC2-Expression des Tumors korrelativ auch mit einem verbesserten Ansprechen gegenüber HDACi einhergeht. Dies hätte zur Folge, dass die Expression vor Behandlungsbeginn bestimmt werden muss, so dass eine entsprechende Anpassung des Therapieregimes möglich ist. Ebenso könnte die Tatsache, dass sowohl Mono- als auch Kombinationstherapie die Expression eines spezifischen Genprofils bedingen, bei der Erforschung von Biomarkern für das therapeutische Ansprechen auf HDACi hilfreich sein (Stimson et al., 2009). Zusammenfassend lässt sich festhalten, dass die Entwicklung von Biomarkern bei der Auswahl und Stratifikation von möglichen Patienten helfen und konsekutiv den therapeutischen Effekt maximieren kann.

Kombinationstherapien mit HDACi sind ein aktuelles Feld der Forschung. Häufig werden dabei willkürlich Substanzen kombiniert ohne eine Erklärung der molekularen Grundlagen für die synergistische Wirkung zu haben. Mit dem wachsenden Verständnis für die molekulare Aktivität von HDACi sollten hier rationale Kombinationsmöglichkeiten gefunden werden. Durch die Kombinationstherapie aus Vorbehandlung mit LBH589 gefolgt von der Anthrazyklin Behandlung kommt es zur Transkription des epigenetisch reaktivierten CITED2, welches wiederum für die Suppression der Chemoresistenzgene verantwortlich ist. Auf Grund dieses Mechanismus gelingt es, Therapieansprechen zu erhöhen, Chemoresistenz zu überwinden und die Tumorgroße zu reduzieren. Jetzt gilt es, diese Therapieform in der klinischen Praxis zu implementieren. Vielversprechende Studien sind zum Teil schon initiiert und zeigen sehr gute Ergebnisse (Munster et al., 2010; Budman et al., 2011). Es bleibt zu hoffen, dass diese Erkenntnisse zeitnah Eingang in die Tumorthherapie finden und die ermutigenden Tendenzen bestätigt werden können. Gegenwärtige onkologische Ansätze tragen heute immer stärker auch der speziellen Tumorsituation des Patienten Rechnung. So stellt diese Therapieform eine gänzlich neue Option in der neoadjuvanten und palliativen Behandlung dar und bietet die Möglichkeit einer Individualisierung in der Magenkrebstherapie.

## 7 Zusammenfassung

Eine hohe HDAC2 Expression beim Magenkarzinom ist mit einer schlechten Prognose assoziiert und stellt einen unabhängigen prognostischen Marker dar. Trotz weitreichender Bemühungen verläuft die konventionelle Therapie dieser Tumorentität vor allem in fortgeschrittenen Stadien oft frustan, was nicht zuletzt einer Resistenz gegenüber systemischen Chemotherapeutika geschuldet ist. Mit dem Einsatz von HDAC-Inhibitoren steht ein neuer Medikamententyp zur Verfügung, der diesen Aspekt berücksichtigt.

In der vorliegenden Arbeit wurde eine HDAC2-Überexpression in drei Kollektiven, nämlich Tumorzelllinien, Patiententumorproben und einem Magenkarzinom-Mausmodell bestätigt. Diese Überexpression bildet die Rationale für die Therapie mit einem HDAC-Inhibitor, wobei hier der neuartige Pan-Histondeacetylaseinhibitor Panobinostat (LBH589) verwendet wurde. In den Tumorzelllinien konnte unter monotherapeutischer Applikation dieses Medikaments eine effektive Wirkung und Reduzierung der Zellviabilität erreicht werden. Im *CEA/Tag* Mausmodell, welches die humane Situation auf Grund der frühen Entwicklung eines orthotopen, hoch proliferativen Tumors realistisch abbildet, wurde nach Monotherapie ebenfalls eine Verringerung der Tumorpheriferation nachgewiesen. Zusätzlich konnte die Frage nach den molekularen Grundlagen partiell beantwortet werden. So führte LBH589 in den Zellen zu einer signifikanten Reduktion der HDAC2-Enzymaktivität sowie zu einer zeit- und dosisabhängigen Histonacetylierung. Des Weiteren konnte die Reaktivierung des Tumorsuppressorgens p21 nachgewiesen werden, dessen epigenetische Supprimierung in der Karzinogenese häufig beobachtet wird. Ein möglicher Wirkmechanismus von LBH589 kann neben der Inhibierung der Enzymaktivität die Degradation von HDAC2 sein. Zugrunde liegt hierbei das proteasomale Ubiquitylierungssystem, wobei es unter LBH589-Behandlung zu einer Hochregulation der beteiligten Ligasen kommt, zu denen auch RLIM und RFL4 gehören. Mit einem spezifischen Knockdown wurde geprüft, ob die analysierten Mechanismen über eine Inhibierung von HDAC1 beziehungsweise HDAC2 zustande kommen. Hierbei zeigte sich sowohl eine verminderte Tumorzellproliferation als auch eine erhöhte Sensibilität der siRNA transfizierten Tumorzellen gegenüber Anthrazyklinen.

Im klinischen Alltag erweist sich die LBH589 Monotherapie trotz positiver Ansätze gegenüber soliden Tumoren oft als insuffizient. In dieser Arbeit konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* eine Überlegenheit der Kombinationstherapie aus LBH589 mit klassischen Chemotherapeutika wie Epirubicin und Doxorubicin im Vergleich zu den entsprechenden Monotherapien gezeigt werden. Im Mausmodell wurde makroskopisch eine signifikante Reduktion der Tumormasse beobachtet, was sich sowohl in der mikroskopischen Messung als auch in der Verringerung des Proliferationsmarkers bestätigte.

Zusammenfassend ergibt sich aus diesem Therapiekonzept ein potentieller Behandlungsansatz für die translationale Medizin. Allerdings bedarf es zusätzlicher, intensiver Forschung und insbesondere der Etablierung weiterer klinischer Studien, damit diese aussichtsreiche Therapiekombination als individualisiertes Behandlungskonzept zeitnah Eingang in die klinische Medizin findet.

## 8 Literaturverzeichnis

- "Tumorregister München. Überleben C16: Magenkarzinom [Internet]. 2011 [aktualisiert 30.06.2011].  
 ." Abrufbar von: [http://www.tumorregister-muenchen.de/facts/surv/surv\\_C16\\_G.pdf](http://www.tumorregister-muenchen.de/facts/surv/surv_C16_G.pdf).
- Archer, S. Y., S. Meng, A. Shei and R. A. Hodin (1998). "p21(WAF1) is required for butyrate-mediated growth inhibition of human colon cancer cells." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **95**(12): 6791-6796.
- Arts, J., P. Angibaud, A. Marien, W. Floren, B. Janssens, P. King, J. van Dun, L. Janssen, T. Geerts, R. W. Tuman, D. L. Johnson, L. Andries, M. Jung, M. Janicot and K. van Emelen (2007). "R306465 is a novel potent inhibitor of class I histone deacetylases with broad-spectrum antitumoral activity against solid and haematological malignancies." *British journal of cancer* **97**(10): 1344-1353.
- Atadja, P. (2009). "Development of the pan-DAC inhibitor panobinostat (LBH589): successes and challenges." *Cancer Lett* **280**(2): 233-241.
- Bach, I., C. Rodriguez-Esteban, C. Carriere, A. Bhushan, A. Krones, D. W. Rose, C. K. Glass, B. Andersen, J. C. Izpisua Belmonte and M. G. Rosenfeld (1999). "RLIM inhibits functional activity of LIM homeodomain transcription factors via recruitment of the histone deacetylase complex." *Nature genetics* **22**(4): 394-399.
- Bhattacharya, S. and P. J. Ratcliffe (2003). "ExCITED about HIF." *Nature structural biology* **10**(7): 501-503.
- Bluethner, T., M. Niederhagen, K. Caca, F. Serr, H. Witzigmann, C. Moebius, J. Mossner and M. Wiedmann (2007). "Inhibition of histone deacetylase for the treatment of biliary tract cancer: a new effective pharmacological approach." *World journal of gastroenterology : WJG* **13**(35): 4761-4770.
- Bolden, J. E., M. J. Peart and R. W. Johnstone (2006). "Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors." *Nat Rev Drug Discov* **5**(9): 769-784.
- Buchwald, M., O. H. Kramer and T. Heinzel (2009). "HDACi--targets beyond chromatin." *Cancer Lett* **280**(2): 160-167.
- Budman, D. R., J. Tai, A. Calabro and V. John (2011). "The histone deacetylase inhibitor panobinostat demonstrates marked synergy with conventional chemotherapeutic agents in human ovarian cancer cell lines." *Invest New Drugs* **29**(6): 1224-1229.
- Burgermeister, E., X. Xing, C. Rocken, M. Juhasz, J. Chen, M. Hiber, K. Mair, M. Shatz, M. Liscovitch, R. M. Schmid and M. P. Ebert (2007). "Differential expression and function of caveolin-1 in human gastric cancer progression." *Cancer Res* **67**(18): 8519-8526.
- Burgess, A., A. Ruefli, H. Beamish, R. Warrener, N. Saunders, R. Johnstone and B. Gabrielli (2004). "Histone deacetylase inhibitors specifically kill nonproliferating tumour cells." *Oncogene* **23**(40): 6693-6701.
- Catalano, M. G., N. Fortunati, M. Pugliese, F. Marano, L. Ortoleva, R. Poli, S. Asioli, A. Bandino, N. Palestini, C. Grange, B. Bussolati and G. Boccuzzi (2012). "Histone deacetylase inhibition modulates E-cadherin expression and suppresses migration and invasion of anaplastic thyroid cancer cells." *The Journal of clinical endocrinology and metabolism* **97**(7): E1150-1159.
- Chong, G. and D. Cunningham (2005). "Can cisplatin and infused 5-fluorouracil be replaced by oxaliplatin and capecitabine in the treatment of advanced oesophagogastric cancer? The REAL 2 trial." *Clin Oncol (R Coll Radiol)* **17**(2): 79-80.
- Correa, P. (2004). "Is gastric cancer preventable?" *Gut* **53**(9): 1217-1219.
- Correa, P., W. Haenszel, C. Cuello, S. Tannenbaum and M. Archer (1975). "A model for gastric cancer epidemiology." *Lancet* **2**(7924): 58-60.
- Cortes-Funes, H. and C. Coronado (2007). "Role of anthracyclines in the era of targeted therapy." *Cardiovasc Toxicol* **7**(2): 56-60.
- Crew, K. D. and A. I. Neugut (2006). "Epidemiology of gastric cancer." *World J Gastroenterol* **12**(3): 354-362.

- Crisanti, M. C., A. F. Wallace, V. Kapoor, F. Vandermeers, M. L. Dowling, L. P. Pereira, K. Coleman, B. G. Campling, Z. G. Fridlender, G. D. Kao and S. M. Albelda (2009). "The HDAC inhibitor panobinostat (LBH589) inhibits mesothelioma and lung cancer cells in vitro and in vivo with particular efficacy for small cell lung cancer." *Molecular cancer therapeutics* **8**(8): 2221-2231.
- Cunningham, D., W. H. Allum, S. P. Stenning, J. N. Thompson, C. J. Van de Velde, M. Nicolson, J. H. Scarffe, F. J. Lofts, S. J. Falk, T. J. Iveson, D. B. Smith, R. E. Langley, M. Verma, S. Weeden, Y. J. Chua and M. T. Participants (2006). "Perioperative chemotherapy versus surgery alone for resectable gastroesophageal cancer." *N Engl J Med* **355**(1): 11-20.
- Deangelo, D. J., A. Spencer, K. N. Bhalla, H. M. Prince, T. Fischer, T. Kindler, F. J. Giles, J. W. Scott, K. Parker, A. Liu, M. Woo, P. Atadja, K. K. Mishra and O. G. Ottmann (2013). "Phase Ia/II, two-arm, open-label, dose-escalation study of oral panobinostat administered via two dosing schedules in patients with advanced hematologic malignancies." *Leukemia*.
- Dejligbjerg, M., M. Grauslund, T. Litman, L. Collins, X. Qian, M. Jeffers, H. Lichenstein, P. B. Jensen and M. Sehested (2008). "Differential effects of class I isoform histone deacetylase depletion and enzymatic inhibition by belinostat or valproic acid in HeLa cells." *Molecular cancer* **7**: 70.
- Di Fazio, P., R. Schneider-Stock, D. Neureiter, K. Okamoto, T. Wissniowski, S. Gahr, K. Quint, M. Meissnitzer, B. Alinger, R. Montalbano, G. Sass, B. Hohenstein, E. G. Hahn and M. Ocker (2010). "The pan-deacetylase inhibitor panobinostat inhibits growth of hepatocellular carcinoma models by alternative pathways of apoptosis." *Cellular oncology : the official journal of the International Society for Cellular Oncology* **32**(4): 285-300.
- Dickson, J. L. and D. Cunningham (2004). "Systemic treatment of gastric cancer." *European journal of gastroenterology & hepatology* **16**(3): 255-263.
- Dokmanovic, M. and P. A. Marks (2005). "Prospects: histone deacetylase inhibitors." *J Cell Biochem* **96**(2): 293-304.
- Eades-Perner, A. M., H. van der Putten, A. Hirth, J. Thompson, M. Neumaier, S. von Kleist and W. Zimmermann (1994). "Mice transgenic for the human carcinoembryonic antigen gene maintain its spatiotemporal expression pattern." *Cancer Res* **54**(15): 4169-4176.
- Eichenmuller, M., I. Gruner, B. Hagl, B. Haberle, J. Muller-Hocker, D. von Schweinitz and R. Kappler (2009). "Blocking the hedgehog pathway inhibits hepatoblastoma growth." *Hepatology* **49**(2): 482-490.
- el-Rifai, W. and S. M. Powell (2002). "Molecular and biologic basis of upper gastrointestinal malignancy. Gastric carcinoma." *Surg Oncol Clin N Am* **11**(2): 273-291, viii.
- Esteller, M. (2008). "Epigenetics in cancer." *N Engl J Med* **358**(11): 1148-1159.
- Ewald, D., M. Li, S. Efrat, G. Auer, R. J. Wall, P. A. Furth and L. Hennighausen (1996). "Time-sensitive reversal of hyperplasia in transgenic mice expressing SV40 T antigen." *Science* **273**(5280): 1384-1386.
- Floris, G., M. Debiec-Rychter, R. Sciot, C. Stefan, S. Fieuws, K. Machiels, P. Atadja, A. Wozniak, G. Faa and P. Schoffski (2009). "High efficacy of panobinostat towards human gastrointestinal stromal tumors in a xenograft mouse model." *Clin Cancer Res* **15**(12): 4066-4076.
- Fraga, M. F., E. Ballestar, A. Villar-Garea, M. Boix-Chornet, J. Espada, G. Schotta, T. Bonaldi, C. Haydon, S. Ropero, K. Petrie, N. G. Iyer, A. Perez-Rosado, E. Calvo, J. A. Lopez, A. Cano, M. J. Calasanz, D. Colomer, M. A. Piris, N. Ahn, A. Imhof, C. Caldas, T. Jenuwein and M. Esteller (2005). "Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer." *Nat Genet* **37**(4): 391-400.
- Fritsche, P., B. Seidler, S. Schuler, A. Schnieke, M. Gottlicher, R. M. Schmid, D. Saur and G. Schneider (2009). "HDAC2 mediates therapeutic resistance of pancreatic cancer cells via the BH3-only protein NOXA." *Gut* **58**(10): 1399-1409.
- George, P., P. Bali, S. Annavarapu, A. Scuto, W. Fiskus, F. Guo, C. Sigua, G. Sondarva, L. Moscinski, P. Atadja and K. Bhalla (2005). "Combination of the histone deacetylase inhibitor LBH589 and the hsp90 inhibitor 17-AAG is highly active against human CML-BC cells and AML cells with activating mutation of FLT-3." *Blood* **105**(4): 1768-1776.

- Glaser, K. B., J. Li, M. J. Staver, R. Q. Wei, D. H. Albert and S. K. Davidsen (2003). "Role of class I and class II histone deacetylases in carcinoma cells using siRNA." *Biochemical and biophysical research communications* **310**(2): 529-536.
- Glimelius, B., K. Ekstrom, K. Hoffman, W. Graf, P. O. Sjoden, U. Haglund, C. Svensson, L. K. Enander, T. Linne, H. Sellstrom and R. Heuman (1997). "Randomized comparison between chemotherapy plus best supportive care with best supportive care in advanced gastric cancer." *Ann Oncol* **8**(2): 163-168.
- Grabsch, H. I., J. M. Askham, E. E. Morrison, N. Pomjanski, K. Lickvers, W. J. Parsons, A. Boecking, H. E. Gabbert and W. Mueller (2004). "Expression of BUB1 protein in gastric cancer correlates with the histological subtype, but not with DNA ploidy or microsatellite instability." *The Journal of pathology* **202**(2): 208-214.
- Greenberg, N. M., F. DeMayo, M. J. Finegold, D. Medina, W. D. Tilley, J. O. Aspinall, G. R. Cunha, A. A. Donjacour, R. J. Matusik and J. M. Rosen (1995). "Prostate cancer in a transgenic mouse." *Proc Natl Acad Sci U S A* **92**(8): 3439-3443.
- Gruner, I. (2010). "Epigenetische Veränderungen des Wnt- und IGF-Signalweges im Hepatoblastom." Dissertation zum Erwerb des Doktorgrades der Humanbiologie an der Medizinischen Fakultät der Ludwig-Maximilians-Universität zu München.
- Guan, J. S., S. J. Haggarty, E. Giacometti, J. H. Dannenberg, N. Joseph, J. Gao, T. J. Nieland, Y. Zhou, X. Wang, R. Mazitschek, J. E. Bradner, R. A. DePinho, R. Jaenisch and L. H. Tsai (2009). "HDAC2 negatively regulates memory formation and synaptic plasticity." *Nature* **459**(7243): 55-60.
- Haefner, M., T. Bluethner, M. Niederhagen, C. Moebius, C. Wittekind, J. Mossner, K. Caca and M. Wiedmann (2008). "Experimental treatment of pancreatic cancer with two novel histone deacetylase inhibitors." *World journal of gastroenterology : WJG* **14**(23): 3681-3692.
- Halkidou, K., L. Gaughan, S. Cook, H. Y. Leung, D. E. Neal and C. N. Robson (2004). "Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer." *The Prostate* **59**(2): 177-189.
- Hamilton, J. P. and S. J. Meltzer (2006). "A review of the genomics of gastric cancer." *Clin Gastroenterol Hepatol* **4**(4): 416-425.
- Hartgrink, H. H., E. P. Jansen, N. C. van Grieken and C. J. van de Velde (2009). "Gastric cancer." *Lancet* **374**(9688): 477-490.
- Henson, D. E., C. Dittus, M. Younes, H. Nguyen and J. Albores-Saavedra (2004). "Differential trends in the intestinal and diffuse types of gastric carcinoma in the United States, 1973-2000: increase in the signet ring cell type." *Arch Pathol Lab Med* **128**(7): 765-770.
- Holliday, R. (1987). "The inheritance of epigenetic defects." *Science* **238**(4824): 163-170.
- Huang, B. H., M. Laban, C. H. Leung, L. Lee, C. K. Lee, M. Salto-Tellez, G. C. Raju and S. C. Hooi (2005). "Inhibition of histone deacetylase 2 increases apoptosis and p21Cip1/WAF1 expression, independent of histone deacetylase 1." *Cell death and differentiation* **12**(4): 395-404.
- Hudler, P. (2012). "Genetic aspects of gastric cancer instability." *ScientificWorldJournal* **2012**: 761909.
- Jemal, A., M. M. Center, C. DeSantis and E. M. Ward (2010). "Global patterns of cancer incidence and mortality rates and trends." *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* **19**(8): 1893-1907.
- Jurkin, J., G. Zupkowitz, S. Lagger, R. Grausenburger, A. Hagelkruys, L. Kenner and C. Seiser (2011). "Distinct and redundant functions of histone deacetylases HDAC1 and HDAC2 in proliferation and tumorigenesis." *Cell Cycle* **10**(3): 406-412.
- Kamangar, F., G. M. Dores and W. F. Anderson (2006). "Patterns of cancer incidence, mortality, and prevalence across five continents: defining priorities to reduce cancer disparities in different geographic regions of the world." *J Clin Oncol* **24**(14): 2137-2150.
- Kang, H. C., I. J. Kim, J. H. Park, Y. Shin, J. L. Ku, M. S. Jung, B. C. Yoo, H. K. Kim and J. G. Park (2004). "Identification of genes with differential expression in acquired drug-resistant gastric cancer cells using high-density oligonucleotide microarrays." *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **10**(1 Pt 1): 272-284.
- Kelly, W. K. e. a. (2001). "Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA), a histone deacetylase inhibitor: biologic activity without toxicity." *ASCO* **20**, 87A (2001).



- Kim, M. S., M. Blake, J. H. Baek, G. Kohlhagen, Y. Pommier and F. Carrier (2003). "Inhibition of histone deacetylase increases cytotoxicity to anticancer drugs targeting DNA." *Cancer Res* **63**(21): 7291-7300.
- Kornberg, R. D. (1974). "Chromatin structure: a repeating unit of histones and DNA." *Science* **184**(139): 868-871.
- Kramer, O. H. (2009). "HDAC2: a critical factor in health and disease." *Trends Pharmacol Sci* **30**(12): 647-655.
- Kramer, O. H., P. Zhu, H. P. Ostendorff, M. Golebiewski, J. Tiefenbach, M. A. Peters, B. Brill, B. Groner, I. Bach, T. Heinzl and M. Gottlicher (2003). "The histone deacetylase inhibitor valproic acid selectively induces proteasomal degradation of HDAC2." *EMBO J* **22**(13): 3411-3420.
- Lagger, G., D. O'Carroll, M. Rembold, H. Khier, J. Tischler, G. Weitzer, B. Schuettengruber, C. Hauser, R. Brunmeir, T. Jenuwein and C. Seiser (2002). "Essential function of histone deacetylase 1 in proliferation control and CDK inhibitor repression." *EMBO J* **21**(11): 2672-2681.
- Lai, I. R., W. J. Lee, M. T. Huang and H. H. Lin (2002). "Comparison of serum CA72-4, CEA, TPA, CA19-9 and CA125 levels in gastric cancer patients and correlation with recurrence." *Hepatogastroenterology* **49**(46): 1157-1160.
- Lauren, P. (1965). "The Two Histological Main Types of Gastric Carcinoma: Diffuse and So-Called Intestinal-Type Carcinoma. An Attempt at a Histo-Clinical Classification." *Acta Pathol Microbiol Scand* **64**: 31-49.
- Lee, H. S., M. H. Park, S. J. Yang, H. Y. Jung, S. S. Byun, D. S. Lee, H. S. Yoo, Y. I. Yeom and S. B. Seo (2004). "Gene expression analysis in human gastric cancer cell line treated with trichostatin A and S-adenosyl-L-homocysteine using cDNA microarray." *Biological & pharmaceutical bulletin* **27**(10): 1497-1503.
- Luger, K., A. W. Mader, R. K. Richmond, D. F. Sargent and T. J. Richmond (1997). "Crystal structure of the nucleosome core particle at 2.8 Å resolution." *Nature* **389**(6648): 251-260.
- Maiso, P., E. Colado, E. M. Ocio, M. Garayoa, J. Martin, P. Atadja, A. Pandiella and J. F. San-Miguel (2009). "The synergy of panobinostat plus doxorubicin in acute myeloid leukemia suggests a role for HDAC inhibitors in the control of DNA repair." *Leukemia* **23**(12): 2265-2274.
- Mann, B. S., J. R. Johnson, M. H. Cohen, R. Justice and R. Pazdur (2007). "FDA approval summary: vorinostat for treatment of advanced primary cutaneous T-cell lymphoma." *Oncologist* **12**(10): 1247-1252.
- Marchion, D. C., E. Bicaku, J. G. Turner, M. L. Schmitt, D. R. Morelli and P. N. Munster (2009). "HDAC2 regulates chromatin plasticity and enhances DNA vulnerability." *Mol Cancer Ther* **8**(4): 794-801.
- Marks, P. A. (2010). "Histone deacetylase inhibitors: a chemical genetics approach to understanding cellular functions." *Biochim Biophys Acta* **1799**(10-12): 717-725.
- Marks, P. A. and W. S. Xu (2009). "Histone deacetylase inhibitors: Potential in cancer therapy." *J Cell Biochem* **107**(4): 600-608.
- Mehdi, O., S. Francoise, C. L. Sofia, G. Urs, Z. Kevin, S. Bernard, S. Igor, C. D. Anabela, L. Dominique, M. Eric and O. Ali (2012). "HDAC gene expression in pancreatic tumor cell lines following treatment with the HDAC inhibitors panobinostat (LBH589) and trichostatin (TSA)." *Pancreatology : official journal of the International Association of Pancreatology* **12**(2): 146-155.
- Minucci, S. and P. G. Pelicci (2006). "Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer." *Nat Rev Cancer* **6**(1): 38-51.
- Moehler, M., S. E. Al-Batran, T. Andus, M. Anthuber, J. Arends, D. Arnold, D. Aust, P. Baier, G. Baretton, J. Bernhardt, H. Boeing, E. Bohle, C. Bokemeyer, J. Bornschein, W. Budach, E. Burmester, K. Caca, W. A. Diemer, C. F. Dietrich, M. Ebert, A. Eickhoff, C. Ell, J. Fahlke, H. Feussner, R. Fietkau, W. Fischbach, W. Fleig, M. Flentje, H. E. Gabbert, P. R. Galle, M. Geissler, I. Gockel, U. Graeven, L. Grenacher, S. Gross, J. T. Hartmann, M. Heike, V. Heinemann, B. Herbst, T. Herrmann, S. Hocht, R. D. Hofheinz, H. Hofler, T. Hohler, A. H. Holscher, M. Horneber, J. Hubner, J. R. Izbicki, R. Jakobs, C. Jenssen, S. Kanzler, M. Keller, R. Kiesslich, G. Klautke, J. Korber, B. J. Krause, C. Kuhn, F. Kullmann, H. Lang, H. Link, F. Lordick,

- K. Ludwig, M. Lutz, R. Mahlberg, P. Malfertheiner, S. Merkel, H. Messmann, H. J. Meyer, S. Monig, P. Piso, S. Pistorius, R. Porschen, T. Rabenstein, P. Reichardt, K. Ridwelski, C. Rocken, I. Roetzer, P. Rohr, W. Schepp, P. M. Schlag, R. M. Schmid, H. Schmidberger, W. H. Schmiegel, H. J. Schmoll, G. Schuch, C. Schuhmacher, K. Schutte, W. Schwenk, M. Selgrad, A. Sandler, J. Seraphin, T. Seufferlein, M. Stahl, H. Stein, C. Stoll, M. Stuschke, A. Tannapfel, R. Tholen, P. Thuss-Patience, K. Treml, U. Vanhoefer, M. Vieth, H. Vogelsang, D. Wagner, U. Wedding, A. Weimann, H. Wilke and C. Wittekind (2011). "[German S3-guideline "Diagnosis and treatment of esophagogastric cancer"]." *Z Gastroenterol* **49**(4): 461-531.
- Mulero-Navarro, S. and M. Esteller (2008). "Epigenetic biomarkers for human cancer: the time is now." *Crit Rev Oncol Hematol* **68**(1): 1-11.
- Munster, P., D. Marchion, E. Bicaku, M. Schmitt, J. H. Lee, R. DeConti, G. Simon, M. Fishman, S. Minton, C. Garrett, A. Chiappori, R. Lush, D. Sullivan and A. Daud (2007). "Phase I trial of histone deacetylase inhibition by valproic acid followed by the topoisomerase II inhibitor epirubicin in advanced solid tumors: a clinical and translational study." *J Clin Oncol* **25**(15): 1979-1985.
- Munster, P., P. Petrou, C. Ryan, T. Jahan, J. DuBois, H. Rugo, J. Chan, K. Thurn, A. Reinert and A. Daud (2010). "A phase I trial of the histone deacetylase inhibitor panobinostat (LBH589) and epirubicin in patients with solid tumor malignancies. ." *J Clin Oncol* **28**(No 15\_suppl).
- Munster, P. N., D. Marchion, S. Thomas, M. Egorin, S. Minton, G. Springett, J. H. Lee, G. Simon, A. Chiappori, D. Sullivan and A. Daud (2009). "Phase I trial of vorinostat and doxorubicin in solid tumours: histone deacetylase 2 expression as a predictive marker." *Br J Cancer* **101**(7): 1044-1050.
- Mutze, K., R. Langer, K. Becker, K. Ott, A. Novotny, B. Lubber, A. Hapfelmeier, M. Gottlicher, H. Hofler and G. Keller (2010). "Histone deacetylase (HDAC) 1 and 2 expression and chemotherapy in gastric cancer." *Ann Surg Oncol* **17**(12): 3336-3343.
- Nakata, S., T. Yoshida, M. Horinaka, T. Shiraishi, M. Wakada and T. Sakai (2004). "Histone deacetylase inhibitors upregulate death receptor 5/TRAIL-R2 and sensitize apoptosis induced by TRAIL/APO2-L in human malignant tumor cells." *Oncogene* **23**(37): 6261-6271.
- Ono, S., N. Oue, H. Kuniyasu, T. Suzuki, R. Ito, K. Matsusaki, T. Ishikawa, E. Tahara and W. Yasui (2002). "Acetylated histone H4 is reduced in human gastric adenomas and carcinomas." *J Exp Clin Cancer Res* **21**(3): 377-382.
- Ottini, L., M. Falchetti, R. Lupi, P. Rizzolo, V. Agnese, G. Colucci, V. Bazan and A. Russo (2006). "Patterns of genomic instability in gastric cancer: clinical implications and perspectives." *Annals of oncology : official journal of the European Society for Medical Oncology / ESMO* **17** Suppl 7: vii97-102.
- Pauer, L. R., J. Olivares, C. Cunningham, A. Williams, W. Grove, A. Kraker, S. Olson and J. Nemunaitis (2004). "Phase I study of oral CI-994 in combination with carboplatin and paclitaxel in the treatment of patients with advanced solid tumors." *Cancer Invest* **22**(6): 886-896.
- Pei, X. Y., Y. Dai and S. Grant (2004). "Synergistic induction of oxidative injury and apoptosis in human multiple myeloma cells by the proteasome inhibitor bortezomib and histone deacetylase inhibitors." *Clin Cancer Res* **10**(11): 3839-3852.
- Plumb, J. A., P. W. Finn, R. J. Williams, M. J. Bandara, M. R. Romero, C. J. Watkins, N. B. La Thangue and R. Brown (2003). "Pharmacodynamic response and inhibition of growth of human tumor xenografts by the novel histone deacetylase inhibitor PXD101." *Molecular cancer therapeutics* **2**(8): 721-728.
- Prince, H. M., M. J. Bishton and S. J. Harrison (2009). "Clinical studies of histone deacetylase inhibitors." *Clin Cancer Res* **15**(12): 3958-3969.
- Rajkovic, A., J. H. Lee, C. Yan and M. M. Matzuk (2002). "The ret finger protein-like 4 gene, Rfp14, encodes a putative E3 ubiquitin-protein ligase expressed in adult germ cells." *Mech Dev* **112**(1-2): 173-177.
- Regel, I., L. Merkl, T. Friedrich, E. Burgermeister, W. Zimmermann, H. Einwachter, K. Herrmann, R. Langer, C. Rocken, R. Hofheinz, R. Schmid and M. P. Ebert (2012). "Pan-histone deacetylase

- inhibitor panobinostat sensitizes gastric cancer cells to anthracyclines via induction of CITED2." *Gastroenterology* **143**(1): 99-109 e110.
- Richon, V. M., T. W. Sandhoff, R. A. Rifkind and P. A. Marks (2000). "Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation." *Proc Natl Acad Sci U S A* **97**(18): 10014-10019.
- Rikiishi, H., F. Shinohara, T. Sato, Y. Sato, M. Suzuki and S. Echigo (2007). "Chemosensitization of oral squamous cell carcinoma cells to cisplatin by histone deacetylase inhibitor, suberoylanilide hydroxamic acid." *Int J Oncol* **30**(5): 1181-1188.
- Sandor, V., A. Senderowicz, S. Mertins, D. Sackett, E. Sausville, M. V. Blagosklonny and S. E. Bates (2000). "P21-dependent G1 arrest with downregulation of cyclin D1 and upregulation of cyclin E by the histone deacetylase inhibitor FR901228." *British journal of cancer* **83**(6): 817-825.
- Schrump, D. S. (2009). "Cytotoxicity mediated by histone deacetylase inhibitors in cancer cells: mechanisms and potential clinical implications." *Clin Cancer Res* **15**(12): 3947-3957.
- Senese, S., K. Zaragoza, S. Minardi, I. Muradore, S. Ronzoni, A. Passafaro, L. Bernard, G. F. Draetta, M. Alcalay, C. Seiser and S. Chiocca (2007). "Role for histone deacetylase 1 in human tumor cell proliferation." *Molecular and cellular biology* **27**(13): 4784-4795.
- Sharma, S., T. K. Kelly and P. A. Jones (2010). "Epigenetics in cancer." *Carcinogenesis* **31**(1): 27-36.
- Shin, J. Y., H. S. Kim, J. Park, J. B. Park and J. Y. Lee (2000). "Mechanism for inactivation of the KIP family cyclin-dependent kinase inhibitor genes in gastric cancer cells." *Cancer Res* **60**(2): 262-265.
- Siegel, R., D. Naishadham and A. Jemal (2012). "Cancer statistics, 2012." *CA Cancer J Clin* **62**(1): 10-29.
- Song, J., J. H. Noh, J. H. Lee, J. W. Eun, Y. M. Ahn, S. Y. Kim, S. H. Lee, W. S. Park, N. J. Yoo, J. Y. Lee and S. W. Nam (2005). "Increased expression of histone deacetylase 2 is found in human gastric cancer." *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica* **113**(4): 264-268.
- Steele, N. L., J. A. Plumb, L. Vidal, J. Tjornelund, P. Knoblauch, A. Rasmussen, C. E. Ooi, P. Buhl-Jensen, R. Brown, T. R. Evans and J. S. DeBono (2008). "A phase 1 pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the histone deacetylase inhibitor belinostat in patients with advanced solid tumors." *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **14**(3): 804-810.
- Stimson, L. and N. B. La Thangue (2009). "Biomarkers for predicting clinical responses to HDAC inhibitors." *Cancer Lett* **280**(2): 177-183.
- Stock, M. and F. Otto (2005). "Gene deregulation in gastric cancer." *Gene* **360**(1): 1-19.
- Subramanian, A., P. Tamayo, V. K. Mootha, S. Mukherjee, B. L. Ebert, M. A. Gillette, A. Paulovich, S. L. Pomeroy, T. R. Golub, E. S. Lander and J. P. Mesirov (2005). "Gene set enrichment analysis: a knowledge-based approach for interpreting genome-wide expression profiles." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(43): 15545-15550.
- Suzumori, N., K. H. Burns, W. Yan and M. M. Matzuk (2003). "RFPL4 interacts with oocyte proteins of the ubiquitin-proteasome degradation pathway." *Proc Natl Acad Sci U S A* **100**(2): 550-555.
- Tahara, E. (2004). "Genetic pathways of two types of gastric cancer." *IARC Sci Publ*(157): 327-349.
- Tate, C. R., L. V. Rhodes, H. C. Segar, J. L. Driver, F. N. Pounder, M. E. Burow and B. M. Collins-Burow (2012). "Targeting triple-negative breast cancer cells with the histone deacetylase inhibitor panobinostat." *Breast cancer research : BCR* **14**(3): R79.
- Thompson, J., T. Epting, G. Schwarzkopf, A. Singhofen, A. M. Eades-Perner, H. van Der Putten and W. Zimmermann (2000). "A transgenic mouse line that develops early-onset invasive gastric carcinoma provides a model for carcinoembryonic antigen-targeted tumor therapy." *Int J Cancer* **86**(6): 863-869.
- Trivedi, C. M., Y. Luo, Z. Yin, M. Zhang, W. Zhu, T. Wang, T. Floss, M. Goettlicher, P. R. Noppinger, W. Wurst, V. A. Ferrari, C. S. Abrams, P. J. Gruber and J. A. Epstein (2007). "Hdac2 regulates the cardiac hypertrophic response by modulating Gsk3 beta activity." *Nat Med* **13**(3): 324-331.
- Tsai, S. C., N. Valkov, W. M. Yang, J. Gump, D. Sullivan and E. Seto (2000). "Histone deacetylase interacts directly with DNA topoisomerase II." *Nature genetics* **26**(3): 349-353.

- Uemura, N., S. Okamoto, S. Yamamoto, N. Matsumura, S. Yamaguchi, M. Yamakido, K. Taniyama, N. Sasaki and R. J. Schlemper (2001). "Helicobacter pylori infection and the development of gastric cancer." *N Engl J Med* **345**(11): 784-789.
- Ungerstedt, J. S., Y. Sowa, W. S. Xu, Y. Shao, M. Dokmanovic, G. Perez, L. Ngo, A. Holmgren, X. Jiang and P. A. Marks (2005). "Role of thioredoxin in the response of normal and transformed cells to histone deacetylase inhibitors." *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* **102**(3): 673-678.
- Van Cutsem, E., V. M. Moiseyenko, S. Tjulandin, A. Majlis, M. Constenla, C. Boni, A. Rodrigues, M. Fodor, Y. Chao, E. Voznyi, M. L. Risse and J. A. Ajani (2006). "Phase III study of docetaxel and cisplatin plus fluorouracil compared with cisplatin and fluorouracil as first-line therapy for advanced gastric cancer: a report of the V325 Study Group." *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **24**(31): 4991-4997.
- Villar-Garea, A. and M. Esteller (2004). "Histone deacetylase inhibitors: understanding a new wave of anticancer agents." *Int J Cancer* **112**(2): 171-178.
- Vogiatzi, P., C. Vindigni, F. Roviello, A. Renieri and A. Giordano (2007). "Deciphering the underlying genetic and epigenetic events leading to gastric carcinogenesis." *J Cell Physiol* **211**(2): 287-295.
- Waddington, C. H. (2012). "The epigenotype. 1942." *Int J Epidemiol* **41**(1): 10-13.
- Wagner, A. D., W. Grothe, J. Haerting, G. Kleber, A. Grothey and W. E. Fleig (2006). "Chemotherapy in advanced gastric cancer: a systematic review and meta-analysis based on aggregate data." *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology* **24**(18): 2903-2909.
- Weichert, W. (2009). "HDAC expression and clinical prognosis in human malignancies." *Cancer Lett* **280**(2): 168-176.
- Weichert, W., A. Roske, V. Gekeler, T. Beckers, M. P. Ebert, M. Pross, M. Dietel, C. Denkert and C. Rocken (2008). "Association of patterns of class I histone deacetylase expression with patient prognosis in gastric cancer: a retrospective analysis." *Lancet Oncol* **9**(2): 139-148.
- Weichert, W., A. Roske, S. Niesporek, A. Noske, A. C. Buckendahl, M. Dietel, V. Gekeler, M. Boehm, T. Beckers and C. Denkert (2008). "Class I histone deacetylase expression has independent prognostic impact in human colorectal cancer: specific role of class I histone deacetylases in vitro and in vivo." *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* **14**(6): 1669-1677.
- Wilson, A. J., D. S. Byun, N. Popova, L. B. Murray, K. L'Italien, Y. Sowa, D. Arango, A. Velcich, L. H. Augenlicht and J. M. Mariadason (2006). "Histone deacetylase 3 (HDAC3) and other class I HDACs regulate colon cell maturation and p21 expression and are deregulated in human colon cancer." *The Journal of biological chemistry* **281**(19): 13548-13558.
- Wittenburg, L. A., L. Bisson, B. J. Rose, C. Korch and D. H. Thamm (2011). "The histone deacetylase inhibitor valproic acid sensitizes human and canine osteosarcoma to doxorubicin." *Cancer chemotherapy and pharmacology* **67**(1): 83-92.
- Yamaoka, Y., M. Kato and M. Asaka (2008). "Geographic differences in gastric cancer incidence can be explained by differences between Helicobacter pylori strains." *Intern Med* **47**(12): 1077-1083.
- Yasui, W., N. Oue, S. Ono, Y. Mitani, R. Ito and H. Nakayama (2003). "Histone acetylation and gastrointestinal carcinogenesis." *Ann N Y Acad Sci* **983**: 220-231.
- Zhang, D. and D. Fan (2010). "New insights into the mechanisms of gastric cancer multidrug resistance and future perspectives." *Future Oncol* **6**(4): 527-537.
- Zhang, Z., H. Yamashita, T. Toyama, H. Sugiura, Y. Ando, K. Mita, M. Hamaguchi, Y. Hara, S. Kobayashi and H. Iwase (2005). "Quantitation of HDAC1 mRNA expression in invasive carcinoma of the breast\*." *Breast cancer research and treatment* **94**(1): 11-16.
- Zhu, P., E. Huber, F. Kiefer and M. Gottlicher (2004). "Specific and redundant functions of histone deacetylases in regulation of cell cycle and apoptosis." *Cell Cycle* **3**(10): 1240-1242.
- Zhu, P., E. Martin, J. Mengwasser, P. Schlag, K. P. Janssen and M. Gottlicher (2004). "Induction of HDAC2 expression upon loss of APC in colorectal tumorigenesis." *Cancer Cell* **5**(5): 455-463.

Zimmermann, S., F. Kiefer, M. Prudenziati, C. Spiller, J. Hansen, T. Floss, W. Wurst, S. Minucci and M. Gottlicher (2007). "Reduced body size and decreased intestinal tumor rates in HDAC2-mutant mice." *Cancer Res* **67**(19): 9047-9054.

## 9 Abkürzungsverzeichnis

5-FU	5-Fluoruracil
AcH4	acetylated histone H4
AML	akute myeloische Leukämie
bp	Basenpaare
BSA	Bovine Serum Albumin
CD	Clusters of Differentiation
DMSO	Dimethylsulfoxid
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DNA	Desoxyribonukleinsäure
cDNA	komplementäre DNA
CEA	karzinoembryonales Antigen
CFA	Colony Formation Assay
d	Tag (day)
FBS	Fetal Bovine Serum
h	Stunde (hour)
HAT	Histon-Acetyltransferase
HDAC	Histon-Deacetylase
HDACi	Histon-Deacetylase Inhibitor
HIF1 $\alpha$	Hypoxia Inducible Factor 1-alpha
M	Mol
mg	Milligramm
MHC	Major Histocompatibility Complex
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimolar
mRNA	messenger RNA
MTT	Tetrazoliumsalsz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazoliumbromid
NAD	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
nM	Nanomol
NT	normal tissue
PBMC	Peripheral Blood Mononuclear Cell (mononukleäre Zelle des peripheren Blutes)
PBS	Phosphate Buffered Saline

PCR	Polymerase Chain Reaction
PDAC	pancreatic ductal adenocarcinoma (duktales Adenokarzinom des Pankreas)
Q-PCR	Quantitative Polymerase Chain Reaction
RFPL4	Ret Finger Protein-Like 4
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reactive Oxygen Species
RPM	revolutions per minute
RT	Raumtemperatur
RT-PCR	realtime Polymerase Chain Reaction
SAHA	Suberoylanilide hydroxamic acid, Vorinostat
S.E.	Standard Error
S.D.	Standard Deviation
SDS	Sodium Dodecyl Sulfate
siRNA	small interfering RNA
SV40 T-Antigen	Simian Vacuolating Virus 40 T-Antigen
TSA	Trichostatin A
TU	Tumor
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
VPA	Valproic acid, Valproat
WT	Wildtyp
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar

## 10 Danksagung

Die vorliegende Arbeit entstand in der Arbeitsgruppe von Prof. Dr. med. M. Ebert an der II. Medizinischen Klinik der TU München. Bei ihm möchte ich mich für die Betreuung und Überlassung des Promotionsthemas bedanken. Seine wissenschaftlichen Impulse und das stete Interesse haben wesentlich zur Entwicklung dieser Arbeit beigetragen.

Für die Bereitschaft, die Position meines Doktorvaters nach dem Weggang von Prof. Ebert an die Medizinische Fakultät Mannheim zu übernehmen, danke ich Herrn Prof. Dr. Schmid.

Den zweifellos größten Dank verdient meine wissenschaftliche Betreuerin Frau Dr. Ivonne Regel. Ihre schier endlose Geduld und Beharrlichkeit half mir nicht nur über die kleinen mathematischen und großen wissenschaftlichen Probleme, sondern auch über so manchen Moment der Frustration hinweg. Ohne sie wäre die Realisierung dieser Arbeit frühestens an Dreisatz und Excel-Gleichungen, spätestens aber an Schreibblockaden und Korrekturverzweiflung gescheitert. Eine derartige Unterstützung zu erfahren, ist zweifellos keine Selbstverständlichkeit, was ich bis heute zu schätzen weiß.

Die Namen aller Labormitglieder der Arbeitsgruppe aufzuzählen würde den hier verfügbaren Rahmen leider sprengen: Jedem Einzelnen danke ich jedoch herzlich für freundliche Aufnahme in die naturwissenschaftliche Gemeinschaft, die stets positive Atmosphäre, für die Hilfsbereitschaft auch an Feiertagen und Wochenenden und für ermunternde Gespräche, die misslungene Experimente vergessen ließen. Stellvertretend sei als Laborleiterin Frau Dr. Elke Burgermeister genannt, der ich für ihre Über- und Weitsicht danken möchte.

Schließlich danke ich meinen Eltern und meinem Bruder, auf deren allumfassende Unterstützung und immerwährende Begleitung ich mich über diese Doktorarbeit hinaus stets verlassen kann.