

Aus dem Institut für Pathologie  
der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

**Proapoptotische und antiproliferative Wirkung des Histondeacetylase-Inhibitors  
LBH589 in Abhängigkeit vom p53- und Chk1-Status**

zur Erlangung des Doktorgrades

Dr. med.

(doctor medicinae)

an der Medizinischen Fakultät  
der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg

vorgelegt von

Johanna Pech

aus

Berlin

Berlin

12. Oktober 2011

*In Gedenken an Dr. med. Ottfried Birk*

## Dokumentationsblatt

### *Bibliographische Beschreibung:*

Pech, Johanna:

Proapoptotische und antiproliferative Wirkung des Histondeacetylase-Inhibitors LBH589 in Abhängigkeit vom p53- und Chk1-Status. - 2011. – 107 Bl.: 31 Abb., 9 Tab.

### *Kurzreferat*

Maligne Tumoren sind die zweithäufigste Todesursache in der Bundesrepublik Deutschland. Bei der Entwicklung neuer Chemotherapeutika konnten mit Histondeacetylase-Inhibitoren sehr vielversprechende Ergebnisse bei einer Vielzahl von Tumorentitäten erzielt werden, so auch beim Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) und dem Plattenepithelkarzinom des Ösophagus, deren bisherige Therapiemöglichkeiten unbefriedigend bleiben.

Die vorliegende Arbeit untersucht die Möglichkeiten der Apoptoseinduktion in Tumorzellen der Zelllinie TE-7 (Plattenepithelkarzinom des Ösophagus) und der Zelllinie SEG-1 (NSCLC) mittels der Behandlung mit dem Histondeacetylase-Inhibitor LBH589 (Panobinostat) *in vitro*. Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die Therapieeffizienz von LBH589 vom p53-Status der Zelllinie abhängt. In der p53-Wildtyp Zelllinie SEG-1 kann dieses wichtige Regulatorprotein p21<sup>waf1</sup>-abhängig eine antiproliferative und antiapoptotische Stressantwort generieren. Ein Apoptosenachweis gelingt bei dieser Zelllinie erst deutlich später und in geringerem Umfang als in der Zelllinie TE-7. Diese Zelllinie zeigt ein Funktionsverlust des p53-Gens, bedingt durch Deletion. Hier kommt es unter der Behandlung mit LBH589 zunächst zu einer Kompensation des p53 Verlustes über die Aktivierung der Checkpointkinase 1 (Chk1), so dass eine antiproliferative und antiapoptotische Stressantwort möglich wird. Parallel bewirkt LBH589 in der Zelllinie TE-7 eine gesteigerte proteasomale Degradation von Chk1, womit der Zelle zu einem späteren Zeitpunkt auch dieser Kontrollmechanismus entzogen wird. Es kommt zu einer drastischen Apoptoseinduktion, vermutlich über die mitotische Katastrophe. Die Ergebnisse weisen darauf hin, dass sich LBH589 insbesondere in Tumoren mit einer p53-Mutation als ein potentes Chemotherapeutikum erweisen könnte.

## Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
ac H3	acetyliertes Histon 3
ac H4	acetyliertes Histon 4
Apaf-1	<i>apoptotic protease activating factor 1</i>
APS	Ammoniumpersulfat
Aqua dest.	Destilliertes Wasser
ATM	<i>ataxia-teleangiectasia mutated</i>
ATR	<i>ATM and Rad3 related</i>
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma 2</i>
BSA	Bovines Serumalbumin
bzgl.	bezüglich
ca.	circa
CAD	<i>Caspase-activated DNase</i>
CDK	<i>cyclin-dependent kinase</i>
cDNA	komplementäre DNA
Chk1	Checkpointkinase 1
DNA	desoxyribonucleic acid
DMSO	Dimethylsulfoxid
dsDNA	doppelsträngige DNA

DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
FCS	Fetales Kälberserum
ggfls.	gegeben falls
h	Stunde/ Stunden
HAT	Histonacetyltransferase/ Histonacetyltransferasen
HDAC	Histondeacetylase/ Histondeacetylasen
HDACI	Histondeacetylase-Inhibitor/ Histondeacetylase-Inhibitoren
Hsp90	<i>heat shock protein 90</i>
kDa	Kilodalton
mind.	mindestens
min	Minute
mRNA	messenger RNA
MTT	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenol-tetrazoliumbromid
NSCLC	<i>non-small cell lung cancer</i>
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PCR	<i>polymerase chain reaction</i>
PBS	<i>phosphate buffered saline</i>
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
RNA	<i>ribonucleic acid</i>

rpm	<i>rounds per minute</i>
s	Sekunden
SAHA	<i>suberoylanilide hydroxamic acid</i>
SDS	<i>sodium dodecyl sulfate</i>
SHP	<i>small heterodimer partner</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
STAT3	<i>signal transducer and activator of transcription</i>
Tab.	Tabelle
TBS	<i>Tris Buffered Saline</i>
TEMED	N,N,N',N'-Tetramethylethylendiamin
Tris	Tris(hydroxymethyl)aminomethan
u. a.	unter anderem
ü. N.	über Nacht
v. a.	vor allem
YY1	<i>ying yang 1</i>
z. B.	zum Beispiel
zw.	zwischen

## Inhaltsverzeichnis

1	Einleitung .....	1
1.1	Epidemiologie von Krebserkrankungen .....	1
1.2	Apoptose im Kontext der Tumorforschung .....	3
1.3	Histondeacetylase-Inhibitoren - neue therapeutische Werkzeuge in der Onkologie .....	4
1.3.1	Klassifikation der Histondeacetylase-Inhibitoren .....	6
1.3.2	Zelluläre Effekte der Histondeacetylase-Inhibitoren .....	7
1.3.3	Stand der klinischen Entwicklung.....	10
1.3.4	LBH589 – Panobinostat .....	11
1.4	Checkpointkinase 1 – Signaltransduktion und Interaktionspartner .....	13
1.5	Fragestellung.....	16
2	Material.....	17
3	Methoden .....	22
3.1	Zellkultur .....	22
3.1.1	Zelllinien .....	22
3.1.2	Zellzucht und Zellpassagierung .....	22
3.1.3	Zellbehandlung.....	23
3.1.3.1	HDAC-Inhibitor LBH589 .....	23
3.1.3.2	Translationsinhibitor Cycloheximid .....	23

3.1.3.3	Proteasominhibitor MG-132.....	24
3.1.4	Zellernte .....	25
3.1.5	Zellzahlbestimmung und Vitalitätstest mit Trypanblau .....	25
3.2	MTT-Assay .....	26
3.3	Durchflusszytometrie .....	27
3.3.1	Zellzyklusanalyse .....	27
3.3.2	Apoptosedetektion mittels Annexin-V Markierung .....	28
3.4	Methoden der Proteinbiochemie .....	29
3.4.1	Gewinnung von Proteinextrakten .....	29
3.4.2	Bestimmung der Proteinkonzentration .....	29
3.4.3	Probenvorbereitung für die SDS-PAGE .....	30
3.4.4	SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) .....	30
3.4.5	Proteintransfer mittels Western Blot.....	31
3.4.6	Proteindetektion .....	31
3.4.7	Densitometrie und Darstellung der Western Blots.....	32
3.5	Molekularbiologische Methoden .....	32
3.5.1	RNA-Isolierung.....	32
3.5.2	Konzentrationsbestimmung von RNA .....	33
3.5.3	Reverse Transkription .....	33
3.5.4	Quantitative PCR .....	34

3.6	Statistische Analyse.....	36
4	Ergebnisse .....	37
4.1	Bestimmung der Zellvitalität der Zelllinien TE-7 und SEG-1 unter der Behandlung mit dem Histondeacetylase-Inhibitor LBH589.....	37
4.2	Charakterisierung des Proteinexpressionsmusters der Zelllinien TE-7 und SEG- 1 unter der Behandlung mit LBH589.....	39
4.3	Analyse der LBH589 induzierten Herunterregulation der Checkpointkinase 1 in den Zelllinien TE-7 und SEG-1 .....	44
4.3.1	Effekt des Translationsinhibitors Cycloheximid auf die Proteinkonzentration der Checkpointkinase 1 unter LBH589- Behandlung .....	45
4.3.2	Effekt des Proteasominhibitors MG-132 auf die Proteinkonzentration der Checkpointkinase 1 unter LBH589-Behandlung .....	48
4.4	Einfluss von LBH589 auf das Apoptoseverhalten der Zelllinien TE-7 und SEG-1 .....	50
4.4.1	Untersuchung der Apoptoseraten mittels Durchflusszytometrie.....	50
4.4.2	Analyse der Expression weiterer apoptosespezifischer Proteine .....	53
4.5	Zellzyklusanalyse der Zelllinien TE-7 und SEG-1 unter Einfluss von LBH589 .....	58
4.5.1	Zellzyklusanalyse mit Hilfe der Durchflusszytometrie .....	59
4.5.2	Zellzyklusanalyse mit Hilfe des mitosespezifischen Antikörpers gegen phospho-H3 .....	61
4.6	Einfluss von LBH589 auf die transkriptionelle Regulation in den Zelllinien TE-7 und SEG-1 .....	62
4.6.1	Untersuchung der Checkpointkinase-1-Expression auf mRNA-Ebene.....	63

4.6.2	Untersuchung der p21 <sup>waf1</sup> -Expression auf mRNA-Ebene .....	64
5	Diskussion .....	65
5.1	Apoptoseinduktion mittels LBH589 in den Zelllinien TE-7 und SEG-1 .....	65
5.2	Unterschiede in den Degradationsmechanismen der Checkpointkinase1 der Zelllinien TE-7 und SEG-1 .....	68
5.3	Einfluss von LBH589 auf die Zellzyklusregulation .....	70
5.4	Zusammenfassung .....	74
5.5	Schlussfolgerung .....	76
5.6	Limitationen .....	77
6	Literaturverzeichnis .....	78
7	Abbildungsverzeichnis .....	91
8	Tabellenverzeichnis .....	94
9	Erklärung .....	95
10	Danksagung .....	96
11	Lebenslauf .....	97

## 1 Einleitung

### 1.1 Epidemiologie von Krebserkrankungen

An Herz-Kreislaufkrankungen versterben in Deutschland mehr Menschen, als an Krebs. Jedoch wirkt die Diagnose Krebs schockierender auf Betroffene, da sie mit Hoffnungslosigkeit und Unheilbarkeit in Verbindung gebracht wird. Die aktuelle Datenlage spricht aber eine andere Sprache. Verbesserungen bei Vorbeugung, Früherkennung und in der Therapie haben dazu beigetragen, dass die altersstandardisierte Krebssterblichkeit von 1980 bis 2006 um 20 % zurück gegangen ist<sup>1</sup>. Dennoch, durch den Anstieg der Lebenserwartung in der Bundesrepublik Deutschland kommt es insgesamt zu einer Zunahme an Krebserkrankungen und infolgedessen auch Todesfällen. Im Jahr 2006 lebten ca. 1,4 Millionen Menschen mit einer Krebserkrankung in Deutschland. Die Inzidenz für 2006 ist mit 426.800 Erkrankungsfällen angegeben. Schätzungen für das Jahr 2010 gehen von einer Inzidenz von mind. 450.000 Krebserkrankungen aus<sup>2</sup>. Das Prostatakarzinom ist die häufigste Krebserkrankung bei Männern. Bei Frauen ist es mit Abstand das Mammakarzinom. Bei beiden Geschlechtern liegt Darmkrebs auf Platz zwei und Lungenkrebs auf Platz drei. In den letzten Jahren konnten die Überlebensraten bei einigen Krebserkrankungen, wie dem malignen Melanom oder dem Prostatakrebs, verbessert werden<sup>3</sup>. Vielen Patienten mit Lungen- oder Ösophaguskarzinom können Ärzte aber bis heute keine längere Überlebenszeit oder Heilung in Aussicht stellen. Die gegenwärtigen Therapieoptionen bei Karzinomen der Lunge und der Speiseröhre sind nicht zufriedenstellend. In den letzten 20 Jahren konnte sich die 5-Jahres-Überlebensrate des Lungenkarzinoms von 13 % im Jahr 1990 auf nur 16 % im Jahr 2005 verbessern<sup>4, 5</sup>. Die 5-Jahres-Überlebensraten des Ösophaguskarzinoms sind seit den 80-er Jahren von 10% auf durchschnittlich 18 % gestiegen<sup>3</sup>. Bei beiden Karzinomen überwiegen bei Erstdiagnose fortgeschrittene Tumorstadien, die durch eine chirurgische Therapie meist nicht mehr kurativ behandelt werden können<sup>6, 7</sup>.

Diese Daten verdeutlichen, dass Krebserkrankungen ein wichtiger Faktor im Gesundheitswesen sind, und durch die alternde Bevölkerung auch in Zukunft bleiben werden. Sie stellen eine große Herausforderung für die gesamte Gesellschaft und deren Finanzsysteme dar. Es müssen

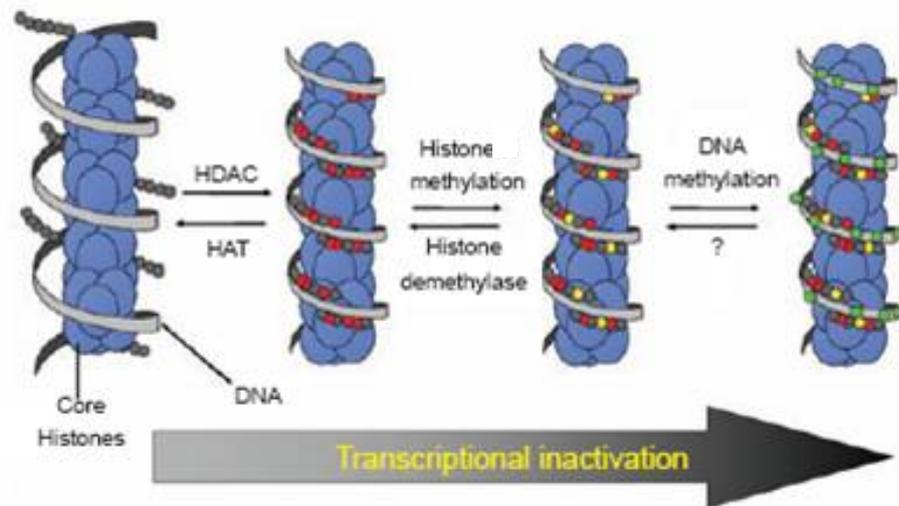


## 1.2 Apoptose im Kontext der Tumorforschung

Die homöostatische Kontrolle der Zellzahl gutartiger Zellpopulationen ist das Resultat einer dynamischen Balance zwischen Zellproliferation und dem programmierten Zelltod. Unter unphysiologischen Bedingungen, z. B. unter dem Einfluss von Noxen, sterben Zellen in der Regel durch den Vorgang der Nekrose. Ein kontrolliertes Absterben, d. h. ein programmierter Zelltod, wird dagegen durch Apoptose erreicht. Bei der Apoptose handelt es sich um einen physiologischen und energieabhängigen Prozess, der es dem Organismus erlaubt, auf veränderte Lebensbedingungen zu reagieren<sup>8</sup>. Eine physiologische Aktivierung der Apoptose findet zum Beispiel im Rahmen der Embryogenese statt, um ein unkontrolliertes Wachstum des Gewebes zu verhindern. Des Weiteren werden Zellen, die ein bestimmtes Alter erreicht haben, durch Apoptose eliminiert<sup>9</sup>. Heute wird allgemein davon ausgegangen, dass Krebs unter anderem durch eine unkontrollierte Proliferation von Zellen charakterisiert ist, die wiederum auf einer Störung des apoptotischen Gleichgewichts basiert<sup>10</sup>. Umfangreiche Forschungen zur Regulation der Apoptose *in vivo* und *in vitro* lassen generell den Rückschluss zu, dass Therapien, die als Ansatzpunkt die gestörten apoptotischen Signaltransduktionswege haben, das Tumorstadium hemmen oder sogar die Tumorstadiumgröße reduzieren können<sup>11</sup>. Außerdem ist eine funktionierende Apoptosekaskade relevant für ein Ansprechen auf Strahlen- und konventionelle Chemotherapie in der Behandlung von Tumoren. So werden Mutationen in Genen, die direkt oder indirekt zu einem Verlust der Apoptosefähigkeit führen, für einen geringen Behandlungserfolg und damit für eine schlechte Prognose verantwortlich gemacht<sup>9</sup>. Daher muss es das Ziel sein, neue Chemotherapeutika zu entwickeln, die genau an diesem Punkt ansetzen und Tumorzellen ihre Apoptosefähigkeit zurückgeben. Damit stellt die Induktion der Apoptose ein vielversprechenden Ansatz in der onkologischen Therapie dar<sup>12</sup>.

### **1.3 Histondeacetylase-Inhibitoren - neue therapeutische Werkzeuge in der Onkologie**

Lange Zeit galt der Grundsatz, dass die Entwicklung von Krebs auf eine große Vielzahl von strukturellen Veränderungen am Genom, wie z. B. die Amplifikation, die Translokation, die Deletion und die Punktmutation<sup>13-15</sup>, zurückzuführen ist. Solche Modifikationen an der DNA-Struktur führen schließlich zur Aktivierung von Onkogenen und zur Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen<sup>16, 17</sup>. Aber, die maligne Entartung von Zellen bleibt nicht nur auf die oben genannten Ursachen beschränkt, vielmehr sind auch epigenetische Einflüsse von Bedeutung<sup>18</sup>. Hierbei definiert der Begriff der Epigenetik alle meiotisch und mitotisch vererbaren Veränderungen in der Genexpression, die nicht in der DNA-Sequenz selbst kodiert sind<sup>19</sup>. Die gebräuchlichsten epigenetischen Mechanismen sind die DNA-Methylierung und die posttranslationale Modifikation von Histonen<sup>20-22</sup>. In den letzten Jahren gab es einen enormen Zuwachs an Wissen über den Zusammenhang von fehlerhafter Histon-Modifikation mit der Entstehung von Krebs. Speziell die Acetylierung von Lysin-Seitenketten der Histone 3 und 4 wurde sehr gut untersucht. Das Maß der Histon-Acetylierung ist abhängig vom Gleichgewicht zwischen den Histonacetyltransferasen (HAT) und den Histondeacetylasen (HDAC). Hierbei spielt das Ausmaß der Histon-Acetylierung eine wichtige Rolle in der Organisation des Chromatins und der Regulierung der Gentranskription<sup>23-25</sup>. Dabei fördert acetyliertes Lysin in Histon-Seitenketten die Transkription von Genen, da es zu einer Öffnung des Chromatins kommt. Die Deacetylierung dagegen erhöht die Affinität zwischen den positiv geladenen Histonen und der negativ geladenen DNA, was zu einer kompakten Chromatin-Struktur führt, wodurch die Gentranskription gedrosselt wird, da der Zugang der Transkriptionsfaktoren eingeschränkt ist.



**Abb. 1.3: Chromatinstruktur in Abhängigkeit des Acetylierungsstatus.** Mit zunehmender Modifikation der Chromatinstruktur kommt es zu einem fortschreitenden Verlust der Transkription. Dabei ist die Änderung durch Acetylierung reversibel. Aus [Gallinari et al, 2007].

Zusätzlich ist die Histon-Acetylierung mit weiteren Regulationsmechanismen und Funktionen des Genoms assoziiert. Zu nennen sind hier neben der Organisation des Chromatins, die DNA-Reparatur und die Rekombination<sup>26, 27</sup>. Zusätzlich können die HDAC die Genexpression über einen weiteren Weg regulieren. Sie interagieren als Bestandteil großer Multiprotein-Komplexe direkt mit verschiedenen Transkriptionsfaktoren, wie z. B. E2f, STAT3, p53 oder das Retinoblastom-Protein<sup>28</sup>. Außerdem sind HDAC auch für die Deacetylierung von Nicht-Histon Proteinen verantwortlich, die wichtige Funktionen innerhalb der Zelle übernehmen. Dadurch bekommen HDAC letztendlich Einfluss auf elementare Bereiche der Zelle, wie Zellzyklus, Differenzierung und Apoptose<sup>29</sup>. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass ein Überwiegen der HDAC-Aktivität, resultierend in einer Hypoacetylierung der Zelle, mit der Entstehung von Krebs, seiner Invasions- und Metastasierungsfähigkeit assoziiert ist<sup>30, 31</sup>. Dies bedeutet, dass HDAC vielversprechende therapeutische Zielstrukturen in der Onkotherapie sind, was zu einer mannigfaltigen Entwicklung von HDAC-Inhibitoren (HDACI) in der letzten Dekade geführt hat<sup>32-34</sup>.

### 1.3.1 Klassifikation der Histondeacetylase-Inhibitoren

Eine große heterogene Gruppe an Substanzen wurde entdeckt, die die Fähigkeit besitzen die Histondeacetylasen zu hemmen<sup>35, 36</sup>. Hierbei handelt es sich bis auf wenige Ausnahmen um Derivate der Hydroxamsäure, Carboxylate, Benzamide, elektrophile Ketone und zyklische Peptide<sup>37, 38</sup>. Die Inhibitoren, die unspezifisch die HDAC-Klassen 1, 2 und 4 hemmen, wie z. B. Panobinostat (LBH589), Vorinostat (SAHA) und Trichostatin A, werden als Pan-HDACI bezeichnet. Einige Substanzen, wie Valproat, Entinostat (MS-275) und Romidepsin (Depsipeptid), haben eine höhere Affinität zu den Klasse 1 HDAC. Der HDACI Tubacin hat als spezifisches Substrat die HDAC 6<sup>39-42</sup>. Alle HDACI verfügen über dasselbe Pharmakophor. Dieses besteht aus einer Kappe, einer Verbindungseinheit, einem Linker und einer Zink-Bindungsgruppe, welches das Kation innerhalb der katalytischen Domäne der HDAC bindet<sup>43</sup>.

**Tab. 1: Zielproteine von HDAC (Auswahl)**

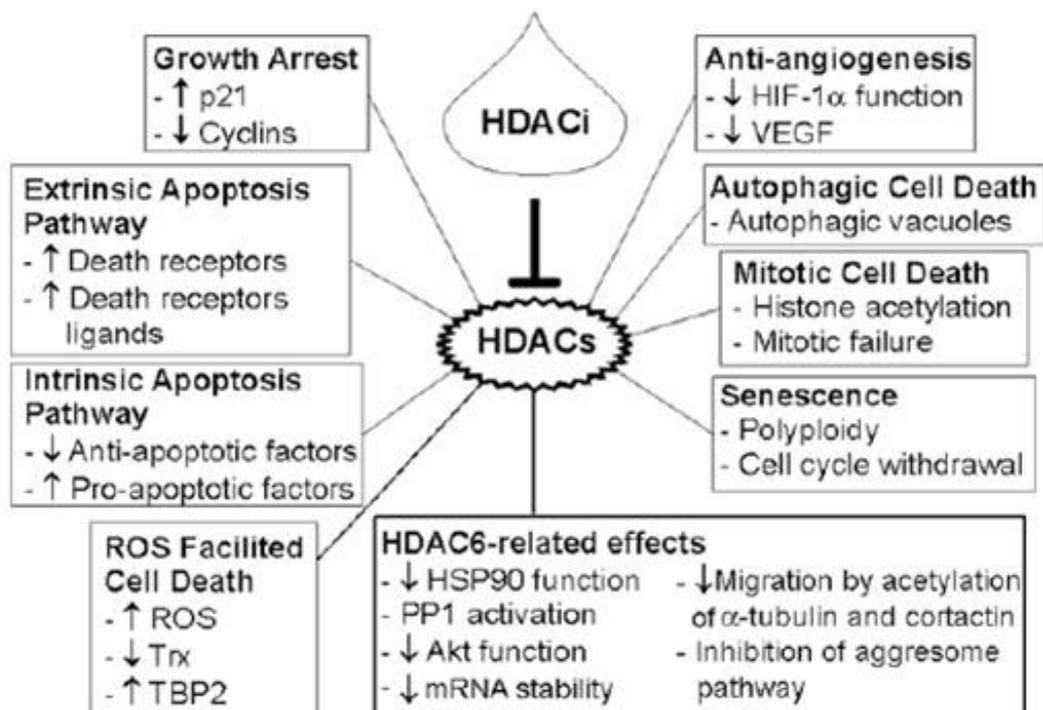
Funktion	Protein	Spezifische HDAC	Referenzen
Strukturprotein	$\alpha$ -Tubulin	HDAC 6	44
Chaperon	Hsp 90	HDAC 6	45
DNA-bindende nukleäre Rezeptoren	Androgenrezeptor	HDAC 1	46
	Glucorticoidrezeptor	HDAC 2	47
	Östrogenrezeptor	Nicht bekannt	48
	SHP	HDAC 1, 3, 6	49
DNA bindende Transkriptionsfaktoren	p53	HDAC 1	50
	p73	Nicht bekannt	51
	YY1	HDAC 1, 2, 3	52
	MyoD	HDAC 1	53
	E2F-1	HDAC 1	54
	E2F-2	Nicht bekannt	50
	E2F-3	Nicht bekannt	50
	PLAG1, PLAG2	HDAC 7	55
	Bcl-6	HDAC 2	56
	c-Myc	Nicht bekannt	50
	EKLF	Nicht bekannt	50
Hif-1 $\alpha$	Nicht bekannt	57	

Ko-Regulatoren der Transkription	Rb	Nicht bekannt	58
	PGC-1 $\alpha$	Klasse 3 HDAC	59
	DEK	Nicht bekannt	60
Chromatin Umbau	HMG-A1	Nicht bekannt	61
	HMG-B1	Nicht bekannt	61
	HMG-B2	Nicht bekannt	61
	HMG-N2	Nicht bekannt	62
	HMG1(Y)	Nicht bekannt	62
	SRI	HDAC 3	63
Signalmediatoren	Stat3	HDAC 1, 2, 3	64
	Smad7	HDAC 1-3, 5, 6	65
	$\beta$ -Catherin	Nicht bekannt	66
DNA-Reperaturenzyme	Ku70	Nicht bekannt	67
	WRN	Nicht bekannt	68

---

### 1.3.2 Zelluläre Effekte der Histondeacetylase-Inhibitoren

Die Wirkweise der HDACI ist hoch komplex und weiterhin nicht vollständig verstanden. Durch ihre Fähigkeit den Acetylierungsstatus von Histonen und Nicht-Histon Proteinen zu ändern haben HDACI verschiedenste biologische Effekte. Es werden Proteine beeinflusst, die an der Regulierung der Genexpression, am extrinsischen und intrinsischen Weg der Apoptose, an der Zellzyklus Progression, am Redox-Signalweg, der Mitose, der DNA-Reparatur, der Zellmigration und der Angiogenese beteiligt sind<sup>29, 69-77</sup>. Außerdem verfügen HDACI über immunmodulatorische Aktivitäten, die ebenfalls für anti-tumoröse Effekte sorgen<sup>78, 79</sup>. Zusätzlich führen HDACI zu einer Abtötung von Tumorzellen, unabhängig davon, ob diese proliferieren oder sich in einer Ruhephase des Zellzyklus befinden. Dies ist ein Gegensatz zu vielen herkömmlichen Tumormedikamenten, die auf eine Proliferation der Zellen angewiesen sind, um effektiv wirken zu können<sup>80</sup>.



**Abb. 1.4 Ansatzpunkte der Histondeacetylase-Inhibitoren.** Zink-abhängige HDAC-Inhibitoren können in Tumorzellen Zellzyklusarrest und Zelltod über verschiedene Signalwege bewirken. Aus [Marks et al, 2009]

Verschiedene Studien ergaben, dass zwischen 2-20 % der exprimierten Gene in ihrer Transkription beeinflussbar sind, wenn die Zellen mit HDACi behandelt werden. Dabei ist das Verhältnis von Genen, die aktiviert werden, zu denjenigen, die supprimiert werden, etwa 1:1<sup>69, 72, 77</sup>. Die Anzahl und die Art der Gene, deren Transkription durch eine HDACi-Behandlung beeinflusst wird, sind abhängig von der Inkubationsdauer, den spezifischen Eigenschaften des jeweiligen Inhibitors und der verwendeten Zelllinie. Einige Veränderungen in der Genexpression scheinen auf direkte Effekte von HDACi an Promotern und Transkriptionsfaktoren hinzuweisen, während andere Veränderungen in der Genexpression durch die Beeinflussung von nachgeschalteten Signalwegen zu Stande kommen<sup>81</sup>. Ein weiterer Mechanismus sind Änderungen in der Anordnung von Transkriptionsfaktor-Komplexen<sup>82</sup>.

HDACi induzieren einen Zellzyklusarrest in normalen Zellen sowie in Tumorzellen. Niedrige Konzentrationen eines HDACi führen hauptsächlich zu einem G1-Arrest, während hohe Kon-

zentrationen einen G1- und einen G2/M-Arrest bewirken<sup>73, 81</sup>. Die Zunahme von Cyclin-abhängigen Kinasen (CDK) und die gleichzeitige Abnahme von Cyclinen durch HDACI wirken synergistisch hinsichtlich einer sinkenden CDK-Aktivität und induzieren einen G1- und G2-Arrest<sup>69, 73</sup>. Das Gen für den CDK-Inhibitor p21<sup>waf1</sup> ist eines der häufigsten Gene, welches durch HDACI verstärkt exprimiert wird. Dies erfolgt p53-unabhängig und korreliert mit den Veränderungen an Proteinen, die mit dem p21<sup>waf1</sup>-Promoter assoziiert sind, wie die vermehrte Acetylierung von Histonen und eine nachweisbare Abnahme der HDAC 1 am Promoter unter rekrutieren der RNA-Polymerase II<sup>82</sup>.

HDACI können den extrinsischen und den intrinsischen Weg der Apoptose auslösen. Sie führen zu einer erhöhten Produktion der sogenannten Todesrezeptoren und ihrer Liganden *in vivo* und *in vitro*, in Tumor-, aber nicht in normalen Zellen. HDACI bewirken also eine Zunahme, bzw. eine Induktion der Expression von Fas und Fas-Ligand, TRAIL und seinem Rezeptor DR-5 und TNF- $\alpha$ <sup>83-87</sup>. Der intrinsische Weg der Apoptose wird als einer der Hauptmechanismen für den durch HDACI induzierten Zelltod angesehen. Die Apoptose wird zum einen durch die Freisetzung von Cytochrom C aus den Mitochondrien aktiviert, zum anderen durch die Aktivierung der Caspase 9. HDACI können die Synthese von pro-apoptischen Proteinen der Bcl-2 Familie, wie z. B. Bim und Bax, steigern, während die Synthese der anti-apoptisch wirksamen Proteine, wie Bcl-2 und Bcl-X<sub>L</sub> gedrosselt wird<sup>69, 73, 88</sup>. Die Überexpression von Bcl-2 kann die HDACI induzierte Apoptose abwenden und stellt somit einen Resistenzmechanismus gegenüber der Wirkung von HDACI dar<sup>89</sup>.

Durch das Auslösen von Defekten innerhalb der Mitose können HDACI in Tumorzellen den Zelltod induzieren. Die erhöhte Rate von Acetylierungen an Histonen führt zu Störungen an der Struktur und der Funktion der Zentromerregion und am perizentrischen Heterochromatin<sup>90</sup>. Außerdem kommt es durch die HDACI-Wirkung zur Degradation von zwei wichtigen Serin/Threonin-Kinasen, Aurora A und B und Survivin, welches eine duale Rolle in der Apoptose und in der Mitose inne hat<sup>90, 91</sup>. Insgesamt zeigen Zellen unter einer HDACI-Behandlung einen transienten Arrest in der Prometaphase, gefolgt von einer anormalen Mitose mit Phänomenen, wie Misseggregation und Chromosomenverlust, was wiederum im Zelltod durch Apoptose oder in der sogenannten mitotischen Katastrophe endet<sup>73</sup>.

Unter der Behandlung mit Vorinostat, Trichostatin A oder Entinostat kommt es in Tumorzellen zu einer Akkumulierung von sogenannten reaktiven Sauerstoffspezies (ROS)<sup>81, 92</sup>. HDACI führen zu einer erhöhten Expression des TBP-2 Gens. TBP-2 bindet und inhibiert Thioredoxin, wodurch ROS in Tumorzellen akkumulieren können, nicht jedoch in normalen Zellen<sup>81</sup>. Dies könnte bedeutend für den HDACI-induzierten Zelltod sein. ROS-Radikalfänger wie das N-Acetylcystein können die Wirkung der HDACI abschwächen.

Die Inhibition der HDAC 6 unterbricht den Aggresom-Signalweg. Die HDAC 6 ist ein Bestandteil des Aggresoms, einer zellulären Formation, die missgefaltete Proteine aggregiert, wenn die normalen Abbauege dieser Proteine beeinträchtigt oder überfordert sind. Die HDAC 6 bindet mono- und polyubiquinierte Proteine. Außerdem bindet sie p150, einen Bestandteil des Dynein-Motorkomplexes, und agiert dadurch als Brücke zwischen dem Dynein-Motor und den ubiquinylierten Proteinen, was die Bildung des Aggresoms ermöglicht. Somit werden durch eine Blockade der HDAC6 Zellen empfindlicher gegenüber Stress, der durch anfallende missgefaltete Proteine zu Stande kommt. Dem folgend kann der Zelltod ausgelöst werden<sup>93</sup>. Diese Mechanismen zeigen, dass die Kombination von HDACI mit Proteasom-Inhibitoren therapeutisch in der Onkologie genutzt werden könnte.

Tumorbedingte Angiogenese kann *in vitro* und *in vivo* durch HDACI geblockt werden, indem es zu einer Suppression von pro-angiogenetischen Faktoren, wie HIF-1 $\alpha$  und VEGF, kommt. Die Funktion des HIF-1 $\alpha$  kann durch die HDACI auf verschiedene Weise gestört werden. Zum einen wird durch eine Acetylierung des HIF-1 $\alpha$  am Lysin 532 seine Degradation initiiert. HIF-1 $\alpha$  bindet an HSP90, HDACI stören aber seine Chaperon-Funktion, wodurch HIF-1 $\alpha$  der proteosomalen Degradation zugeführt werden kann<sup>29, 69, 94</sup>. Außerdem können HDACI die Angiogenese unterbinden, indem sie endotheliale Zellen daran hindern, auf den angiogenen Stimulus zu reagieren, der durch VEGF in den Zellen ausgelöst wird<sup>29, 69, 73</sup>. Diese Beobachtungen unterstützen die Verwendung von HDACI in Kombination mit VEGF-Inhibitoren in der Onkologie.

### 1.3.3 Stand der klinischen Entwicklung

Die klinische Entwicklung von Histondeacetylase-Inhibitoren ist ein großes und aktives Feld in der Forschung<sup>71, 72, 95</sup>. Laut der Daten des *National Institute of Health* der U.S.A. wurden insgesamt 137 klinische Studien mit über 15 strukturell verschiedenen HDACI durchgeführt

[www.clinicaltrials.gov]. Es werden die Wirkungen von HDACI als Monotherapeutikum und in Kombinationstherapien geprüft. Eine große Vielzahl an hämatologischen und soliden Tumorentitäten werden dabei untersucht, wie z. B. Chronische Lymphatische Leukämie (CLL), Hodgkin Lymphom, B-Zell Lymphom, Hirntumore, Melanome, Lungenkrebs, Ösophaguskarzinom, hepatische Malignome, Ovarialkarzinom, Nierenzellkarzinom, und andere<sup>96-98</sup>. Als erster HDACI wurde Vorinostat 2006 von der *Food and Drug Administration* für die klinische Behandlung des fortgeschrittenen kutanen T-Zell Lymphoms zugelassen<sup>99, 100</sup>. Im November 2009 folgte die Zulassung für Istodax (Romidepsin), ebenfalls für die Behandlung des kutanen T-Zell Lymphoms<sup>101</sup>. Ein vielversprechender Marker dafür, dass eine biologisch aktive Dosis *in vivo* erreicht wurde, ist die Akkumulation von acetylierten Histonen in mononukleären Zellen des peripheren Blutes. Es findet sich dabei aber kein Zusammenhang zur klinischen Effektivität. Die bisher beobachteten Nebenwirkungen beinhalten Übelkeit, Dehydratation, Diarrhö, Fatigue und Thrombozytopenie. Mit dem Ende der Medikamentenapplikation sind die Nebenwirkungen allesamt reversibel<sup>102</sup>. In den Jahren 2008 bis 2010 kam es allein in den U.S.A. zur Anmeldung von 100 Patenten, die mit der Entwicklung von neuen, bzw. der Modifikation von bekannten HDACI im Zusammenhang stehen<sup>103</sup>.

### 1.3.4 LBH589 – Panobinostat

Unter den in großer Anzahl entwickelten HDACI der letzten Dekade ist Panobinostat (LBH589, Novartis Pharmaceuticals) ein vielversprechender Vertreter seiner Substanzklasse. Er wurde bereits an vielen verschiedenen Tumorentitäten erprobt, so dass über LBH589 bereits viele Daten über Pharmakokinetik, Pharmakodynamik und Dosisfindung gesammelt wurden<sup>104</sup>. LBH589 ist ein Derivat der Hydroxamsäure und ein sogenannter Pan-HDACI, da er die HDAC-Klassen 1, 2 und 4 suffizient inhibiert. Bei Zellen des kutanen T-Zell-Karzinom, der chronischen myeloischen Leukämie (CLL), der akuten myeloischen Leukämie (AML), des Hodgkin-Lymphoms, bei Brust-, Prostata-, Kolon- und Pankreaskarzinom-Zelllinien konnte durch die Behandlung mit Panobinostat eine zytotoxische Wirkung und eine Wachstumsinhibition nachgewiesen werden<sup>105</sup>. In präklinischen Studien konnte gezeigt werden, dass LBH589 in nanomolaren Konzentrationen sehr gute anti-tumorigene Effekte zeigte<sup>106, 107</sup>. Ein zusätzlicher Vorteil ist die minimale toxische Wirkung auf normale Zellen<sup>102</sup>. Im Vergleich zu anderen HDAC-Inhibitoren verfügt Panobinostat über eine höhere Wirksamkeit in Bezug auf Proliferation und

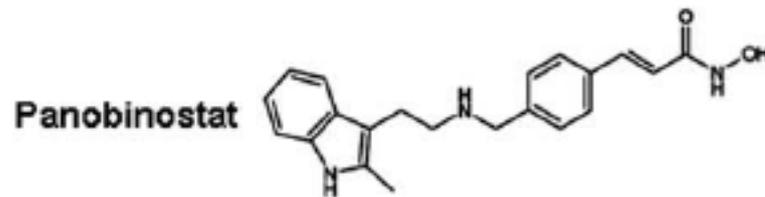
Vitalität von Karzinomzellen. In der kolorektalen Karzinomzelllinie HCT116, der Mammakarzinom-Zelllinie BT474 und der kutanen T-Zell Lymphom-Zelllinie HH werden Zellproliferation und Viabilität durch Panobinostat in nanomolaren Konzentrationen inhibiert, die 100-fach geringer sind als die Konzentrationen von Vorinostat und MGCD0103<sup>108-111</sup>.

**Tab. 2 Effekt von Panobinostat auf die Vitalität von Krebszellen im Vergleich zu Vorinostat und MGCD0103.**

	Panobinostat		Vorinostat		MGCD0103	
	IC <sub>50</sub>	LD <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub>	LD <sub>50</sub>	IC <sub>50</sub>	LD <sub>50</sub>
	[nM]	[nM]	[nM]	[nM]	[nM]	[nM]
HH	1,8	8,3	647	1497	244,5	677,5
HCT 116	7,1	51,7	1040	3660	419,8	1411
BT 474	2,6	22,4	1152	5195	702,5	1335

HH entspricht einer kutanen T-Zell Lymphom-Zelllinie, BT474 einer Mammakarzinom-Zelllinie und HCT116 einer kolorektalen Karzinomzelllinie. Die IC<sub>50</sub> ist die mittlere inhibitorische Konzentration, LC<sub>50</sub> die mittlere letale Konzentration. Moifiziert nach Atadja, 2009

In den Zelllinien PC9 und A549 des Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms (NSCLC) zeigt Panobinostat ebenfalls gute antiproliferative und proapoptotische Effekte. In dieser Studie zeigen sich eine Herunterregulation der Chk1-Expression und eine damit verbundene Apoptoseinduktion v. a. über den Weg der mitotischen Katastrophe. Desweiteren stellt sich heraus, dass die Abnahme der Chk1-Proteinkonzentration sehr viel genauer mit dem Ausmaß der Zytotoxizität korreliert als die Histon-Hyperacetylierung. Dies gilt nicht nur für die Zelllinien sondern auch *ex vivo* für NSCLC-Zellen, die von Patienten gewonnen wurde. Damit könnte das Ausmaß der Chk1-Repression ein klinisch relevanter Marker für die pharmakodynamische Effektivität des HDACI Panobinostat sein<sup>112</sup>.



**Abb. 1.5 Strukturformel von Panobinostat (LBH589)**

Neben der nachgewiesenen guten Wirksamkeit beim kutanen T-Zell-Lymphom zeigt Panobinostat sehr vielversprechende klinische Effekte bei weiteren hämatologischen Krebserkrankungen, wobei hier besonders das Hodgkin-Lymphom zu nennen ist. Eine klinische Phase-II-Studie untersuchte 2010 die Wirkung einer oralen Panobinostat Medikation bei rezidiviertem und/oder refraktärem Hodgkin-Lymphom bei Patienten, die bereits eine autologe Stammzell-Transplantation erhalten hatten. In dieser Studie erreichten 82 % (n=106) der Patienten eine stabile Phase der Erkrankung und 74 % (n=96) erreichten eine Tumorregression über ein medianes Follow-up von 9,6 Monaten. Eine partielle oder komplette Regression, der primäre Endpunkt der Studie, erfolgte bei 27 % (n=35) der Patienten. Dabei betrug die mediane progressionsfreie Zeit 10,5 Monate<sup>113</sup>. Aufgrund dieser vielversprechenden Ergebnisse sind einige Phase-III-Studien mit Panobinostat in Arbeit. Neben der weiteren Analyse der Therapieeffizienz von Panobinostat beim Hodgkin-Lymphom wird dessen Wirksamkeit außerdem beim Multiplen Myelom untersucht. Alleine an dem *U. S. National Institutes of Health* [[www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov)] sind 74 klinische Studien, die die Wirksamkeit von Panobinostat an den unterschiedlichsten Tumorentitäten untersuchen, angemeldet. Die meisten von ihnen befinden sich in Phase I und II der klinischen Entwicklung. Es bleibt abzuwarten, ob sich die bisherigen klinischen Erfolge von Panobinostat in Zukunft weiterführen lassen und welche Tumorentitäten letztendlich am besten auf diesen HDACI ansprechen.

#### **1.4 Checkpointkinase 1 – Signaltransduktion und Interaktionspartner**

Der Zellzyklus ist ein elementarer Prozess der Zelle, der durch viele regulatorische Kaskaden stetig überwacht und kontrolliert wird. Eine wichtige Komponente dieses Kontrollsystems sind die verschiedenen Kontrollpunkte, auch Checkpoints genannt. Kommt es zu einer Dysfunktion dieser Checkpoints, ist dies als pathologisches Kennzeichen für eine neoplastische Entwicklung

zu werten<sup>114</sup>. Im Besonderen Interesse dieser Arbeit liegt die Checkpointkinase 1 (Chk1), eine Serin/Threonin-Kinase mit einem Molekulargewicht von 54 kDa. Im Unterschied zur Checkpointkinase 2 ist die Checkpointkinase 1 essentiell. Chk1-defiziente Mäuse sterben in der frühen embryonalen Entwicklung, im Gegensatz zu lebensfähigen Chk2-defizienten Mäusen<sup>115</sup>.

Vor allem für die Regulierung der S- und G<sub>2</sub>/M-Checkpoints wird Chk1 exprimiert<sup>116</sup>. Selbst wird Chk1 durch einige verschiedene Mechanismen reguliert. Die Aktivierung durch Phosphorylierung an den Serin-Resten 317 und 345 erfolgt durch die übergeordneten Sensor-Moleküle ATR und ATM als Reaktion auf DNA-Schäden<sup>117, 118</sup>. Dabei ist Chk1 das bevorzugte Substrat von ATR und Chk2 von ATM, eine Koaktivierung wird diskutiert<sup>119-121</sup>. Auf transkriptioneller Ebene reguliert p53 die Chk1-Expression herunter, zum einen in Abhängigkeit von p21<sup>waf1</sup> und dem Retinoblastoma Protein, zum anderen über eine direkte DNA-Bindung<sup>122, 123</sup>.

Die Phosphorylierung einer Fülle von Effektormolekülen wird durch Chk1 bewirkt. Dadurch werden Bereiche der Zelle beeinflusst, die alle im Zusammenhang mit den Reparaturmechanismen nach erfolgter DNA-Schädigung stehen, wie Zellzyklus, DNA-Reparatur, Apoptose und Chromatin Remodeling<sup>117, 124-126</sup>. Durch eine Phosphorylierung von p53, v. a. am Serin-Rest 20, kommt es zu einer Auflösung der p53-Hdm-2 Interaktion und damit zur Stabilisierung von p53 in Abhängigkeit von Stresssignalen<sup>127-129</sup>. Dadurch kommt es zu einem negativen Feedback-Mechanismus, der nach erfolgter DNA-Reparatur durch die p53 vermittelte Chk1-Repression dafür sorgt, dass eine Fortsetzung des Zellzyklus nach G<sub>2</sub>-Arrest möglich wird<sup>122</sup>.

Die Phosphatase Cdc25A sorgt über das Entfernen der inhibitorischen Phosphatgruppen am Threonin-Rest 14 und 15 des Cdk2-Moleküls für eine Cyclin abhängige Aktivierung von Cdc2 und somit für eine Progression im Zellzyklus<sup>130</sup>. Kommt es jedoch zu einer Aktivierung von Chk1 wird Cdc25A durch diese Kinase am Serin 216 phosphoryliert und somit inaktiviert. Zum einen geschieht dies über einen verstärkten proteasomalen Abbau, zum anderen kann das 14-3-3-Protein nun Cdc25 binden, wodurch es zusätzlich in seiner Aktivität eingeschränkt wird<sup>131-133</sup>. In einem ungestörten Zellzyklus ist konstitutiv gebildetes Chk1 für einen geringen Grundumsatz für Cdc25A verantwortlich<sup>134</sup>. Bei einsetzendem genotoxischen Stress, führt die Chk1 abhängige Destabilisierung von Cdc25A zu einer Verzögerung des Zellzyklus. Die Zelle bekommt da-

durch Zeit entstandene Schäden an der DNA zu beheben und somit die genomische Integrität zu bewahren<sup>114</sup>.

Der S-Phase-Checkpoint registriert v. a. strukturelle DNA-Schäden, wie Doppelstrangbrüche und Störungen innerhalb der Replikationsgabel; Abnormalitäten, die u. a. durch ionisierende Strahlung verursacht werden und die Integrität des Genoms gefährden. Der Signalweg ist ebenfalls Chk1-Cdc25A-vermittelt<sup>135</sup>.

Am G<sub>2</sub>-M-Checkpoint wird in Anwesenheit von DNA-Schäden der Eintritt in die Mitose verhindert<sup>136</sup>. Die Schlüsselfunktion hat dabei der Komplex aus Cyclin B/Cdc2 inne. Die Aktivierung dieses Komplexes und damit der Eintritt in die Mitose benötigt, wie bereits beschrieben, die Entfernung von zwei spezifischen Phosphatgruppen durch Cdc25A oder Cdc25C. Auch an diesem Punkt greift Chk1 durch die Phosphorylierung der Cdc25-Kinasen regulierend ein. Zur Aufrechterhaltung des G<sub>2</sub>-M-Checkpoints ist die Anwesenheit von p53 notwendig<sup>137</sup>. Es konnte gezeigt werden, dass ein Außerkräftsetzen des G<sub>2</sub>-M-Checkpoints über die Inhibition von Chk1 Zellen mit einem Verlust der p53-Funktion sensitiver auf Chemotherapeutika ansprechen, im Vergleich zu Zellen mit normaler p53-Funktion<sup>138, 139</sup>.

Bei den meisten Tumorzellen ist ein defekter G1-S-Checkpoint vorhanden, der zu einem Selektionsvorteil führt. Dadurch sind sie aber unter genotoxischem Stress, der die Integrität des Genoms gefährden kann, vermehrt abhängig von einem funktionierenden G2-Checkpoint. Kommt es nun unter Gabe von DNA-schädigenden Substanzen zu einer Hemmung des G2-Checkpoints, kann dies zur sogenannten mitotischen Katastrophe und somit zum Zelltod führen<sup>140, 141</sup>. Da Chk1 für die Aufrechterhaltung des G2-Checkpoints unter DNA-Schäden verantwortlich ist, bietet die Hemmung von Chk1 durch Wegfall des G2-Checkpoints die Möglichkeit, dass durch Radiatio oder Chemotherapie induzierte DNA-Schäden akkumulieren können und damit den Zelltod der Tumorzellen induzieren. Somit stellen Chk1-Inhibitoren einen vielversprechenden Ansatz in der Tumorthherapie dar, um die Wirkung von radio- oder chemotherapeutischer Maßnahmen zu steigern<sup>112, 142, 143</sup>.

## 1.5 Fragestellung

Dank großer Fortschritte in der molekularbiologischen Grundlagenforschung gibt es ein immer größer werdendes Wissen über die molekularen Abläufe in Tumorzellen. Dieses Wissen wird für die Entwicklung von neuen Medikamenten in der Onkologie genutzt. Ein Beispiel ist hier die Entwicklung von Histondeacetylase-Inhibitoren. Diese neuartige Wirkstoffgruppe hat in verschiedenen Studien bisher vielversprechende antitumoröse Effekte in Zellen des Nichtkleinzelligen Lungenkarzinoms (NSCLC) und des Plattenepithelkarzinoms des Ösophagus gezeigt<sup>34, 112, 144, 145</sup>.

Die vorliegende Arbeit untersucht die Möglichkeiten der Apoptoseinduktion in Zellen der Zelllinie TE-7 (Plattenepithelkarzinom des Ösophagus) und der Zelllinie SEG-1 (NSCLC) mittels der Behandlung mit dem Histondeacetylase-Inhibitor LBH589. Speziell wird hierbei der Focus auf den unterschiedlichen p53-Status der beiden Zelllinien gelegt, da in bis zu 50 % der Tumoren das p53-Gen mutiert ist und daraus ein verändertes Ansprechen auf Chemotherapeutika resultiert<sup>146</sup>. Der Zelllinie TE-7 fehlt ein funktionierendes p53-Tumorsuppressorgen, während bei SEG-1 der p53-Wildtyp gebildet wird. Desweiteren soll mit dieser Arbeit die Bedeutung der Checkpointkinase 1 bei der Apoptoseinduktion durch LBH589 untersucht werden. Dafür wurden verschiedene molekularbiologische Methoden, wie Western Blot, Durchflusszytometrie (Apoptosedetektion mittels Annexin-V, Zellzyklusanalyse), *Real-Time* PCR u. a. verwendet. Die Checkpointkinase 1 führt zu einem zeitweiligen Zellzyklusarrest, damit eine Reparatur von Schäden an der DNA erfolgreich stattfinden kann. Hierdurch können Tumorzellen der Akkumulation von DNA-Schäden und damit letztendlich der mitotischen Katastrophe entgehen. Besonders in p53<sup>-/-</sup>-Zellen verhindert die Aktivierung von Chk1 unter der Behandlung mit Chemotherapeutika den erhofften Zelltod der Tumorzellen<sup>147</sup>. Die Induktion von Mängeln in der Checkpoint-Maschinerie und damit die Auslösung einer mitotischen Katastrophe ist ein vielversprechender Ansatz in der Tumorthherapie<sup>148</sup>. Daher wird in dieser Arbeit ebenfalls die Auswirkung von LBH589 auf den Zellzyklus der Zelllinien TE-7 und SEG-1 untersucht.

## 2 Material

Geräte/Verbrauchsmaterial	Hersteller
Agarosegelkammer	BioRad
Bio Photometer	Eppendorf
Blotting Chamber Mini Protean II	BioRad
CO <sub>2</sub> Air-Jacketed Incubator	Nuaire
Coulter-Partielle Count & Size Analyzer	Beckmann Coulter
DNA Engine Peltier Thermal Cycler 200	MJ Research
Eppendorfröhrchen 0,5-2 ml	Eppendorf
FACS DIVA	BD Biosciences
Falkon Tubes	Greiner Bio-One
GeneGnome	Syngene Bio Imaging
Hämozytometer	Neubauer Zählkammer
LightCycler 2.0	Roche Diagnostics
MRX Revelation <i>microplate reader</i>	DYNEX Technologies
Multiphor II Elektrophoresekammer	Pharmacia
Nitrocellulose-Membran	Whatman, Schleicher & Schuell
Petrischale 90 mm	Corning Incorporated
Pipetten	Eppendorf
Pipettierhilfe Pipetus-akku	Hirschmann Laborgeräte
Programmable Thermal Controller 100	MJ Research
Rocking Platform	VWR
Sicherheitswerkbank HERAsafe	Heraeus
Spritzenfilter steril	Carl Roth GmbH
Tischzentrifuge Biofuge pico	Heraeus
Ultraschall-Desintegrator Sonoplus HD 70	Bandelin Electronic
Variomag Electronic Rührer	Monotherm
Vortex reaxtop	Heidolph
Waage	Satorius
Wasserbad	GFL
Zellkulturflasche 75 cm <sup>2</sup>	TPP AG
Zellkulturplatte 96-well, 6-well	TPP AG
Zellschaber, steril	TPP AG
Zentrifuge 5403	Eppendorf
Chemikalien/Reagenzien	Hersteller
Acrylamid	Carl Roth GmbH
APS	Sigma-Aldrich GmbH
Bisacrylamid	BioRad
BSA	Carl Roth GmbH

Chloroform	Sigma-Aldrich GmbH
Cycloheximid	Sigma-Aldrich GmbH
DMEM	PAA Laboratories GmbH
DMSO	PAN Biotech GmbH
DTT	Sigma-Aldrich GmbH
Ethanol 96 %	Carl Roth GmbH
FCS	PAN Biotech GmbH
Glycin	Carl Roth GmbH
Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate	Millipore
Isopropanol 100 %	Carl Roth GmbH
Kaliumchlorid	Sigma-Aldrich GmbH
LBH589	Novartis GmbH
L-Glutamin 200nM	PAA Laboratories
Methanol	Carl Roth GmbH
MG-132	Calbiochem
Milchpulver	Carl Roth GmbH
MTT-Salz	Sigma-Aldrich GmbH
PBS	Carl Roth GmbH
Penicillin/Streptomycin	PAA Laboratories
PMSF	Sigma-Aldrich GmbH
Ponceau S	Carl Roth GmbH
Protease-Inhibitor-Cocktail Set III	Calbiochem
Restore Western Blot Stripping Buffer	Thermo Scientific
SDS	Serva Electrophoresis GmbH
TEMED	Carl Roth GmbH
Tris Base	Carl Roth GmbH
Trizol	Invitrogen Corporation
Trypanblaulösung 0,4 %	Sigma-Aldrich GmbH
Trypsin-EDTA	PAN Biotech GmbH
Tween 20	Carl Roth GmbH
Urea	Merck

Puffer/Lösungen	Zusammensetzung
PBS (1x)	137 mM NaCl 2,6 mM KCl 10 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,8 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> In Aqua dest, pH 7,4
TBS (1x)	1 M Tris 5 M NaCl In Aqua dest, pH 8,0

Protein-Lysispuffer	4 M Urea 0,5 % SDS 62,5 mM Tris, pH 6,8 1 Spatelspitze Bromphenolblau Vor Gebrauch Zugabe von: Protease-Inhibitor-Cocktail-Set III 1 mM PMSF
Sammelgelpuffer	1,875 M Tris-Base 0,5 % SDS pH 6,8 in Aqua dest.
Trenngelpuffer	1,875 M Tris-Base 1 % SDS pH 8,8 in Aqua dest.
Laufpuffer SDS-PAGE (5x)	0,25 M Tris-Base 1,95 M Glycin 1 % SDS In Aqua dest.
Laufpuffer SDS-PAGE (1x)	Verdünnung 1:5 in Aqua dest.
Transferpuffer	25 mM Tris-Base 192 mM Glycin 16 % Methanol pH 8,3 in Aqua dest.
Proben-Ladepuffer (5x)	4 M Urea 62,5 mM Tris-Base 10 % SDS 20 % DTT 1 Spatelspitze Bromphenolblau In Aqua dest.
Proben-Ladepuffer (2x)	4 M Urea 62,5 mM Tris-Base 2 % SDS 1 Spatelspitze Bromphenolblau In Aqua dest.
Ponceau S Lösung	50 ml 3 %ige Essigsäure 300 µl Ponceau SL
Waschpuffer (TBST)	TBS (1x)

	0,1 % Tween 20 1 M Tris-Base pH 8 5 M NaCl
Blockingpuffer (5 %)	TBST 5 % Magermilchpulver
MTT-Lösung	5 mg MTT-Salz 1 ml PBS

Gele für SDS-PAGE	Zusammensetzung	
Sammelgel (5 %)	Aqua dest.	6,33ml
	30 % Acrylamid	1,65 ml
	Samelgelpuffer	2 ml
	10 % APS	75 µl
	TEMED	8 µl
Trenngel (10 %)	Aqua dest.	4,67 ml
	30 % Acrylamid	3,33 ml
	Trenngelpuffer	2 ml
	10 % APS	75 µl
	TEMED	8 µl
Trenngel (12 %)	Aqua dest.	3,93 ml
	30 % Acrylamid	3,93 ml
	Trenngelpuffer	2 ml
	10 % APS	75 µl
	TEMED	8 µl

Kitsystem	Hersteller
D <sub>c</sub> Protein Assay Kit	BioRad
Reverse Transkriptase System Kit	Promega Corporation
<i>LightCycler FastStart DNA Master HybProbe</i>	Roche Diagnostics

Primärantikörper/Proteinstandard	Hersteller
Anti-Acetyl-Histone 3, <i>rabbit</i> , polyclonal	Upstate
Anti-Acetyl-Histone 4, <i>rabbit</i> , polyclonal	Upstate

Anti- $\beta$ -Actin, <i>mouse</i> , monoclonal	Sigma-Aldrich GmbH
Anti-Bcl2, <i>rabbit</i> , polyclonal	Cell Signaling Technology
Anti-Bid, <i>rabbit</i> , polyclonal	Cell Signaling Technology
Anti-Caspase 3, <i>rabbit</i> , polyclonal	Cell Signaling Technology
Anti-Caspase 8, <i>mouse</i> , monoclonal	Cell Signaling Technology
Anti-Caspase 9, <i>rabbit</i> , polyclonal	Cell Signaling Technology
Anti-Chk1, <i>mouse</i> , monoclonal	Santa Cruz Biotechnology
Anti-p21 <sup>waf1</sup> , <i>mouse</i> , monoclonal	Santa Cruz Biotechnology
Anti-p53, <i>mouse</i> , monoclonal	Calbiochem
Anti-phospho-Chk1 (Ser 317), <i>rabbit</i> , polyclonal	Novus Biologicals
Anti-phospho-Histon H2A.X (Ser 139), <i>mouse</i> , monoclonal	Upstate
Anti-phospho-Histon H3 (Ser 10), <i>rabbit</i> , Polyclonal	Cell Signaling Technology
Protein-Leiter, biotinyliert	Cell Signaling Technology

Sekundärantikörper	Hersteller
Anti-Biotin (HRP konjugiert)	Cell Signaling Technology
<i>Goat-anti-mouse</i> (HRP konjugiert)	Pierce Biotechnology
<i>Goat-anti-rabbit</i> (HRP konjugiert)	Thermo Scientific

Sequenzen (5'-3') der Primer/Hybridisierungssonden	Gen
Fw TGT TGG ATG GGG ATA AC Rev AAA CAT CAA CTG GTT CTG C GTT CAA CAA ACG CTC ACG ATT ATT-FL LC Red640-TAC CGA AAT ACT GTT GCC AAG CC-Ph	Checkpointkinase 1
Fw CCA GCA GAG AAT GGA AAG TC Rev GAT GCT GCT TAC ATG TCT CG TTC TTC AGT AAG TCA ACT TCA ATG TCG GA-FL LC Red640-ATG AAA CCC AGA CAC ATA GCA ATT CAG-Ph	$\beta$ 2-Micro-Globulin

## 3 Methoden

### 3.1 Zellkultur

#### 3.1.1 Zelllinien

Für diese Studie wurde zum einen die humane ösophageale Plattenepithelkarzinom-Zelllinie TE-7 verwendet. Dies ist eine gering differenzierte Plattenepithelkarzinom-Zelllinie, mit einer Mutation im p53 Gen. Sie wurde von Herrn Professor El-Rifai von der Vanderbilt University zur Verfügung gestellt. Zum anderen wurde die Zelllinie SEG-1 verwendet. Sie ist eine Zelllinie des Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms (NSCLC), welche den p53 Wildtyp besitzt. Sie stammt von Herrn Professor Beer von der University of Michigan. Beide Zelllinien wachsen adhärent. Die Kultivierung erfolgte im Brutschrank bei 37 °C, 5 % CO<sub>2</sub> und 95 % Luftfeuchtigkeit. Für die Zelllinie SEG-1 wurde dem Kulturmedium DMEM 10 % fetales Kälberserum, 1 % Penicillin/Streptomycin und 1 % L-Glutamin zugesetzt. Bei der Zelllinie TE-7 wurde das Kulturmedium DMEM zusätzlich mit 10 % fetalem Kälberserum und 1 % Penicillin/Streptomycin versetzt.

#### 3.1.2 Zellzucht und Zellpassagierung

Um die Zelllinien in Kultur zu nehmen wurde eine kryokonservierte Probe der Zellen im Wasserbad erwärmt und sofort nach dem Auftauen mit 20 ml erwärmten Nährmedium in eine 75 cm<sup>2</sup> Zellkulturflasche pipettiert. Die Zellen inkubierten für maximal 24 h unter den bereits beschriebenen Bedingungen im Brutschrank. Danach wurde das Medium entfernt, die Zellen mit PBS gewaschen und die Zellkulturflasche mit frischem Kulturmedium versetzt. Die Inkubation im Brutschrank wurde fortgesetzt. Das Kulturmedium wurde alle zwei bis drei Tage erneuert.

Wurde eine Konfluenz von 80 % erreicht, konnten die Zellen umgesetzt werden. Dafür wurde das alte Medium entfernt und die Zellen mit 10 ml erwärmten PBS gewaschen, um dann für 1 min trypsinisiert zu werden. Nach 5 min (Zelllinie SEG-1), bzw. 10 min (Zelllinie TE-7) Inkubation im Brutschrank, wurden die Zellen mit 10 ml erwärmten Kulturmedium vom Boden der Zellkulturflasche vorsichtig abgespült und in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Die Zellzahl wurde mit Hilfe des Zellcounters ermittelt. Für die weitere Kultivierung wurde eine entsprechende Anzahl von Zellen in neue Zellkulturflaschen mit 20 ml frischem und 37 °C warmem

Kulturmedium gegeben. Für die einzelnen Versuche wurden die Zellen, z. B. auf 10ner Platten, mit einer Zellzahl von  $1,1 \times 10^6$  (TE-7) und  $1,5 \times 10^6$  (SEG-1) ausgesät.

### **3.1.3 Zellbehandlung**

#### **3.1.3.1 HDAC-Inhibitor LBH589**

Anfänglich wurden die Zellen auf einer 96-*well*-Platte ausgesät. TE-7 mit einer Zellzahl von  $7,5 \times 10^3$ , SEG-1 mit  $1 \times 10^4$  pro Kavität. Die Zellen wurden 24 h nach dem Aussäen mit den Konzentrationen 0,01  $\mu\text{M}$ , 0,05  $\mu\text{M}$ , 0,1  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$  des HDAC-Inhibitor LBH589 für 6 h, 24 h und 48 h behandelt. Dies war nötig um eine geeignete Konzentration dieser Substanz für die weiteren Versuche mit Hilfe eines Cytotoxizitätstest zu ermitteln. Dafür wurde zuerst das alte Medium verworfen und die Zellen mit PBS gewaschen. Anschließend wurden 200  $\mu\text{l}$  frisches Medium mit der jeweiligen LBH589-Konzentration zugegeben und die Platten für die entsprechenden Zeiträume inkubiert. Die Cytotoxizität wurde mit Hilfe des MTT-Assays bestimmt.

Nachdem 0,05  $\mu\text{M}$  LBH589 als optimale Behandlungskonzentration ermittelt wurde, wurden 10ner Platten mit  $1,1 \times 10^6$  (TE-7) und  $1,5 \times 10^6$  (SEG-1) Zellen besät. Nach frühestens 20 h wurde zunächst eine 0,05  $\mu\text{molare}$  LBH589-Lösung mit dem Kulturmedium der jeweiligen Zelllinie hergestellt. Das alte Medium wurde verworfen, die Platten einmal mit PBS gewaschen und das Kulturmedium mit 0,05  $\mu\text{M}$  LBH589 konnte auf die Platten gegeben werden. Die Zellen inkubierten jeweils für 6 h, 24 h und 48 h im Brutschrank. Dann erfolgte, wie unten beschrieben, die Zellernte.

#### **3.1.3.2 Translationsinhibitor Cycloheximid**

Für die Bestimmung einer geeigneten Konzentration des Translationsinhibitors Cycloheximid (CHX) wurden die Zelllinien auf 6-*well*-Platten ausgesät. TE-7 mit einer Zellzahl von  $2,2 \times 10^5$  und SEG-1 mit  $3 \times 10^5$  Zellen pro *well*. Als Testkonzentrationen wurden absteigend 30, 24 und dann 20  $\mu\text{g/ml}$  CHX in 2 ml Kulturmedium in ihrer Zytotoxizität untersucht. Nach einer Inkubationszeit von 24 h wurde die Vitalität mit Hilfe der Trypanblaumethode ermittelt.

Nachdem die Konzentration von 20 µg/ml als geeignete Behandlungskonzentration ermittelt wurde, wurden 10ner Platten für je 15 min, 30 min, 1 h, 3 h, 6 h und 24 h für die Ansätze Kontrolle, CHX, Kombination aus CHX und LBH589 und LBH589 ausgesät. Nach 24 h konnte mit der Behandlung begonnen werden. Zunächst sollten diejenigen Ansätze, welche CHX allein oder CHX in Kombination mit LBH589 enthielten, mit CHX für eine Stunde inkubiert werden. Dazu wurde frisches und auf 37 °C erwärmtes Kulturmedium der entsprechenden Zelllinie mit 20 µg/ml CHX versetzt. Nun wurde zunächst von sämtlichen Platten das Medium verworfen und mit PBS gewaschen. Dann bekamen die Ansätze Kontrolle und LBH589 9 ml frisches CHX-freies Kulturmedium, die beiden anderen Ansätze 9 ml des CHX-Mediums. Alle Platten wurden für eine Stunde im Brutschrank inkubiert. Es wurden vorerst 9, statt den üblichen 10 ml Medium, verwendet, weil anschließend an die eine Stunde Inkubation der HDAC-Inhibitor LBH589 zu den entsprechenden Ansätzen hinzugefügt werden musste. Da jeder Platte noch 1 ml der entsprechenden Zusammensetzung fehlte, wurden vier Reaktionsgefäße vorbereitet. Eines mit reinem Kulturmedium für die Kontrollansätze, eines mit 20 µg CHX pro ml Medium, eines mit 20 µg CHX pro ml Medium und der Menge des LBH589 für eine gesamte Platte mit der Endkonzentration 0,05 µM pro ml Nährmedium und ein Gefäß, welches nur das LBH589 im Medium enthielt. So konnte nach einer Stunde CHX-Vorinkubation jeder Platte 1 ml des entsprechenden Ansatzes hinzu gefügt werden. Danach erfolgte erneut die Inkubation im Brutschrank über die entsprechenden Zeiträume. Anschließend wurden die Zellen geerntet und gezählt.

#### **3.1.3.3 Proteasominhibitor MG-132**

Der Proteasominhibitor MG-132 wurde in den Konzentrationen 5 µM und 10 µM getestet. Die Vorgehensweise entsprach der beim Translationsinhibitor CHX.

Nach der Ermittlung von 5 µM als geeignete Versuchskonzentration wurden 10ner Platten ausgesät für den Zeitwert 24 h mit den fünf Ansätzen Kontrolle, MG-132, MG-132 und LBH589, LBH589 und DMSO. Das weitere Prozedere entspricht dem des CHX-Versuches. Die Ansätze mit dem Proteasominhibitor MG-132 mussten wieder eine Stunde inkubieren, bevor das LBH589 hinzu gegeben wurde. Die Ansätze mit DMSO wurden genau wie die mit MG-132 gehandhabt, damit die Wirkzeiten übereinstimmten. Es wurde die gleiche Menge an DMSO eingesetzt, wie für die Herstellung der 5 µM-Lösung an MG-132 eingesetzt wurde, da für die

Stocklösung MG-132 in DMSO gelöst wurde. Zu den entsprechenden Zeitpunkten wurden die Zellen, wie beschrieben, geerntet.

#### **3.1.4 Zellernte**

Die Zellernte erfolgte zu den festgesetzten Zeitpunkten. Die Kontrolle wurde nach 24 h geerntet. Zuerst wurden mittels Zellschaber die Zellen vorsichtig von der Zellkulturplatte mechanisch gelöst und der Überstand in ein 50 ml Reaktionsgefäß überführt. Dann wurden ca. 5 ml eiskaltes PBS auf die Zellkulturplatte gegeben, und es wurde erneut geschabt. Wieder wurde der Überstand in das Reaktionsgefäß überführt. Mit einer Pipette wurde nochmals PBS auf die Platte gegeben und gut gespült. Anschließend wurde der gesammelte Überstand bei 4 °C und 4600 rpm für 15 min zentrifugiert. Danach wurde der Überstand vorsichtig dekantiert und 10 ml PBS hinzu gefügt. Erneut wurde für 15 min bei 4600 rpm und 4 °C zentrifugiert und der Überstand verworfen. Das Zellpellet wurde in 1,5 ml PBS aufgenommen, vorsichtig resuspendiert und in ein 2 ml Eppendorfröhrchen überführt. Nachdem die Probe 10 min bei 12000 rpm und 4 °C zentrifugiert wurde, konnte der Überstand vorsichtig abpipettiert werden und das Eppendorfröhrchen in flüssigem Stickstoff Schock gefroren werden. Die Lagerung der Zellpellets erfolgte bei -80 °C.

Für die Versuche mit Cycloheximid und MG-132 wurde die Zellernte modifiziert. Zuerst wurden die Zellen, wie oben beschrieben, trypsinisiert und gezählt. Dann wurde für jede Versuchsreihe die gleiche Anzahl an Zellen für die Herstellung eines Pellets eingesetzt, z. B.  $1 \times 10^6$ . Dies geschah deshalb, weil beide Substanzen, CHX und MG-132, Einfluss auf den Proteinumsatz der Zelle nehmen. Somit kann davon ausgegangen werden, dass sich auch die Konzentration von  $\beta$ -Actin, als Haushaltsgen, über die Dauer der Versuchsreihe verändern kann. Damit wäre keine vernünftige Ladekontrolle mit  $\beta$ -Actin im Western Blot mehr möglich. Durch den Einsatz äquivalenter Zellzahlen wurde dieses Problem umgangen.

#### **3.1.5 Zellzahlbestimmung und Vitalitätstest mit Trypanblau**

Neben der Zellzahlbestimmung mit dem Zellcounter wurde die Anzahl der lebenden Zellen mit der Trypanblaumethode bestimmt. Trypanblau wird aufgrund ihrer Membrandurchlässigkeit nur von avitalen Zellen aufgenommen und färbt diese tiefblau an. Lebende Zellen erscheinen unter dem Mikroskop leuchtend hell. Jedoch ist bei zu langer Einwirkzeit des Trypanblaus eine

Zunahme von toten Zellen zu beobachten, da dieser Farbstoff zytotoxisch wirkt. Die Zellsuspension einer Probe wurde mit einer 0,4 %igen Trypanblaulösung 1:5 verdünnt und gemischt. Die Zellzahlbestimmung erfolgte mit Hilfe eines Hämozytometers (Neubauer Zählkammer). Hierzu wurde die Zellsuspension in die Zählkammer pipettiert und mit einem Deckglas abgedeckt. Die Auszählung der Zellen erfolgte unter dem Mikroskop (10fache Vergrößerung). Es wurden alle vier großen Eckquadrate ausgezählt und der Mittelwert berechnet. Die ermittelte Zellzahl wurde mit  $10^4$  sowie mit dem Verdünnungsfaktor der Zellsuspension multipliziert.

Die Ermittlung der Zellvitalität mit Hilfe der Trypanblaumethode ist ebenfalls möglich. Hierzu werden die Gesamtzahl der Zellen und die Anzahl der ungefärbten (vitalen) Zellen bestimmt. Der Prozentsatz der ungefärbten Zellen entspricht dem Anteil vitaler Zellen.

### **3.2 MTT-Assay**

Mit Hilfe des MTT-Assays kann die Zytotoxizität einer Substanz ermittelt werden. Das gelbe Tetrazolium-Salz 3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-Diphenol-tetrazoliumbromid wird in den Mitochondrien vitaler Zellen durch eine Reduktase zum blauvioletten Farbstoff Formazan gespalten. Diese Formazan-Kristalle sind impermeabel und reichern sich deshalb in lebenden Zellen an. Damit ist die Menge des gebildeten Farbstoffes proportional zu der Anzahl vitaler Zellen. Durch die Zugabe eines organischen Lösungsmittels werden die Kristalle aus den Zellen gelöst und die Extinktion kann bei 570 nm photometrisch gemessen werden. Über den Vergleich mit einer unbehandelten Kontrollgruppe lässt sich so der Anteil vitaler Zellen bestimmen, womit eine geeignete Behandlungskonzentration für den HDAC-Inhibitor LBH589 ermittelt werden konnte.

Die Durchführung des MTT-Assays erfolgte auf 96-well Platten als Sechsfach-Bestimmung. Es wurden  $9 \times 10^3$  (TE-7), bzw.  $8,5 \times 10^3$  (SEG-1) Zellen pro Kavität in 200  $\mu$ l Kulturmedium ausgesät und 24 h im Brutschrank inkubiert. Nach der Entfernung des Mediums und einmaligem Waschen der Zellen mit PBS wurden sie mit den verschiedenen LBH589-Konzentrationen (siehe 3.1.3) behandelt und für 6 h, 24 h und 48 h inkubiert. Am Ende des jeweiligen Behandlungszeitraums wurde das Medium zusätzlich mit 10  $\mu$ l einer MTT-Lösung versetzt und erneut für 2 h inkubiert. Für die MTT-Lösung wurden 5 mg des MTT-Salzes in 1 ml PBS gelöst und über ei-

nen sterilen Spritzenfilter von verbleibenden kleinsten Partikeln gefiltert. Nach Ablauf der Inkubationszeit wurde das Medium vorsichtig entfernt und zu jeder Kavität wurden 100 µl DMSO hinzu gegeben. Anschließend wurde die 96-well Platte für 15 min auf den Schüttler gestellt. Die Extinktion wurde bei 570 nm mit dem MRX Revelation *microplate reader* gemessen und mit der Software DYNEX Revelation 4.22 der Firma DYNEX Technologies ausgewertet.

### 3.3 Durchflusszytometrie

Die Durchflusszytometrie - synonym dazu ist der Begriff FACS (*fluorescence activated cell sorting*) - ist eine Methode zur Analyse von Einzelzellen in Zellsuspensionen auf der Grundlage von Streulicht- und Fluoreszenzeigenschaften. Sie erlaubt die simultane Messung der relativen Zellgröße, der Granularität und zwei bis drei Fluoreszenzfarben für mehrere tausend Einzelzellen in wenigen Sekunden. Mittels Messung von Lichtstreuung können Zellgröße (*forwardscatter*) und Granularität (*sidescatter*) ermittelt werden. Die Verwendung von Fluoreszenzfarbstoffen ermöglicht die Selektion von Zellen mit bestimmten Eigenschaften. Zellen, die mit fluoreszenzgekoppelten Antikörpern markiert wurden, können so vom Analysegerät erkannt werden. Zum Markieren von Liganden werden häufig die Fluorochrome Fluorescein-Isothiocyant (FITC) und Phycoerythrin (PE) verwendet.

#### 3.3.1 Zellzyklusanalyse

Mit Hilfe der Durchflusszytometrie kann der DNA-Gehalt der Zellkerne bestimmt werden. Dieser verdoppelt sich während der S-Phase des Zellzyklus und halbiert sich wieder während der Mitose. Auf diese Weise kann über den DNA-Gehalt die Position einer Zelle im Zellzyklus ermittelt werden. In der G1-Phase ist der Chromosomensatz diploid, in der G2-Phase tetraploid und während der S-Phase weisen die Zellkerne einen DNA-Gehalt auf, der zwischen dem der G1- und der G2-Phase liegt. Nach Aktivierung des apoptotischen Programms kommt es zur DNA-Fragmentierung, so dass Zellen, die sich in einem mittleren bis späteren Stadium der Apoptose befinden, einen geringeren DNA-Gehalt aufweisen als diploide Zellen der G1-Phase. Der Farbstoff Propidiumiodid (PI) interkaliert in doppelsträngige Nukleinsäuren und zeigt somit eine stöchiometrische Wechselwirkung mit DNA, d. h. DNA-Konzentration und Farbstoffkonzentration sind wechselseitig voneinander abhängig. Durch die Kopplung des Farbstoffs PI an ein

Fluorchrom kann die Fluoreszenzintensität der Kerne mit der Durchflusszytometrie gemessen werden. Diese nimmt somit proportional zum DNA-Gehalt der Zelle zu.

Das Arbeiten erfolgte auf Eis. Der Überstand des entsprechenden Ansatzes wurde in einem Reaktionsgefäß aufgefangen. Die Platten wurden mit ca. 2 ml PBS gewaschen, welches ebenfalls in das Reaktionsgefäß überführt wurde. Nun wurden die Zellen trypsinisiert, die Platte wurde noch einmal mit PBS gewaschen. Die gesammelte Zellsuspension wurde gezählt, um  $1 \times 10^6$  Zellen in ein neues Reaktionsgefäß überführen zu können. Anschließend wurden die Zellen bei 750 rpm und 4 °C für 15 min zentrifugiert. Der Überstand konnte danach vorsichtig dekantiert werden. Das Zellpellet wurde in 200 µl der hypotonen PI-Lösung, die nach den Angaben des Herstellers vorbereitet wurde, aufgenommen und gut durchmischt. Anschließend inkubierte die Probe im Dunkeln 30 min auf Eis, bevor die Messung erfolgen konnte. Die Auswertung wurde mit Hilfe der Software Cell Quest Pro von BD Bioscience durchgeführt.

### 3.3.2 Apoptosedetektion mittels Annexin-V Markierung

Bei frühapoptotischen Zellen wird das Membranlipid Phosphatidylserin von der Innenseite auf die Außenseite der Zellmembran transloziert. Annexin-V ist ein  $\text{Ca}^{2+}$ -abhängiges Phospholipidbindendes Protein mit einer hohen Affinität zu Phosphatidylserin. Somit ist über die Annexin-V-Markierung die Detektion von apoptotischen Zellen in Zellgemischen möglich. Da aber bei spätapoptotischen, bzw. nekrotischen Zellen die Zellmembran permeabel für Annexin-V wird und diese somit auch über das Annexin-V nachgewiesen werden würden, wäre eine sichere Differenzierung zwischen apoptotischen und nekrotischen Zellen nicht mehr möglich. Daher wird ein zweiter Farbstoff, Propidiumiodid (PI), verwendet, der nur die permeabilisierte Membran nekrotischer Zellen durchdringen kann und dort die DNA anfärbt. Somit stellen sich vitale Zellen im Dotplot als Annexin-V- und PI-negativ (*lower left*) dar, apoptotische Zellen sind Annexin-V-positiv und PI-negativ (*lower right*) und nekrotische Zellen sind Annexin-V- und PI-positiv (*upper right*). Damit die Antikörper Annexin-V und PI im Durchflusszytometer erkannt und gemessen werden können, müssen sie mit einem Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt werden. Während der Messung werden die so markierten Zellen von einem Laserstrahl erfasst. Dadurch kommt es zu einer Anregung der Fluoreszenzfarbstoffe, die daraufhin Licht einer be-

stimmten Wellenlänge emittieren. Dieses spezifische Signal wird gemessen und die Differenzierung zwischen den Antikörpern Annexin-V und PI wird ermöglicht.

Die Zellen wurden zunächst wie beschrieben trypsinisiert, wobei die Überstände jedoch gesammelt wurden. Das Arbeiten erfolgte auf Eis. Die Zellzahl wurde ermittelt und  $1 \times 10^6$  Zellen in ein Reaktionsgefäß gegeben, welches bei 4 °C, 200 g für 5 min zentrifugiert wurde. Der Überstand wurde vorsichtig dekantiert und das Zellpellet in 100 µl der Annexin-V-Fluos Lösung, welche bereits nach den Angaben des Herstellers vorbereitet wurde, resuspendiert. Dieser Ansatz musste für 15 min bei Raumtemperatur im Dunkeln inkubieren. Danach erfolgte die Messung mit einem Durchflusszytometer und die Auswertung mit Hilfe der Software Cell Quest Pro der Firma BD Bioscience.

## **3.4 Methoden der Proteinbiochemie**

### **3.4.1 Gewinnung von Proteinextrakten**

Zur Extraktion von zellulären Proteinen wurden Trockenpellets auf Eis in 100-500 µl denaturierendem Protein-Lysispuffer resuspendiert und darin eine Stunde inkubiert, wobei im Abstand von jeweils 10 min die Proben gevortext wurden. Um die Zellen vollständig aufzuschließen, wurden sie anschließend für 10-15 Zyklen sonifiziert und bei -80 °C eingefroren.

### **3.4.2 Bestimmung der Proteinkonzentration**

Die Bestimmung der Proteinkonzentration erfolgte mit einem Kit der Firma BioRad nach der Methode von Lowry. Um die unbekannte Proteinkonzentration bestimmen zu können, wurde eine Proteinstandardeihe mit acht bekannten BSA-Konzentrationen (0-3 mg/ml) mitgeführt. 20 µl von der Reagenz S wurden in 1 ml Reagenz A gelöst. In einer 96-well Platte wurden jeweils 5 µl Proteinstandard und 5 µl Protein-Lysat als Doppelbestimmung aufgetragen. Darauf wurden 25 µl des Reagenzgemisches aus A+S pipettiert und 200 µl von Reagenz B hinzu gegeben. Die Platte wurde unter Schütteln für 15 min inkubiert, anschließend konnte die Absorption bei 750 nm gemessen werden. Den Mittelwerten der jeweiligen Absorptionswerte wurde automatisch eine Proteinkonzentration anhand der Standardkurve zugewiesen.

### 3.4.3 Probenvorbereitung für die SDS-PAGE

Für die SDS-PAGE wurden 30 µg Protein eingesetzt. Zum Protein-Lysat wurde ein Fünftel des entsprechenden Volumens in Form von 5 x Proben-Ladepuffer hinzu gegeben und mit 2 x Proben-Ladepuffer auf ein einheitliches Volumen, meist zw. 25-30 µl, aufgefüllt. Die Proben wurden gevortext, abzentrifugiert und nach der Denaturierung (95 °C für 5 min) sofort auf Eis gestellt und auf das Gel geladen. Zur Identifikation der Banden wurde ein biotinylierter Molekulargewichtsmarker mitgeführt, der zuvor bei 99 °C für 2 min denaturiert wurde.

### 3.4.4 SDS-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) ist eine gebräuchliche Methode um Proteine aus Proteingemischen nach ihrer Molekularmasse aufzutrennen. Durch die Wirkung des anionischen Detergenz SDS (*Sodium Dodecyl Sulfate*) werden nichtkovalente Bindungen der Proteine aufgehoben. Als Folge davon gehen die höheren Proteinstrukturen verloren, so dass das Protein nur noch in gestreckter linearer Form vorliegt. Das stark negativ geladene SDS überdeckt zudem die Eigenladung der Proteine, wodurch negativ geladene SDS-Protein-Komplexe mit einem konstanten Verhältnis von Ladung zu Masse entstehen. Diese Komplexe der verschiedenen Proteine unterscheiden sich nur noch in ihrer Größe und besitzen vergleichbare hydrodynamische Eigenschaften. Im elektrischen Feld wandern die SDS-Protein-Komplexe zur Anode und werden dabei vom Molekularsiebeffekt einer porösen Polyacrylamidmatrix nach ihrem Molekulargewicht aufgeteilt, wobei kleinere Proteinmoleküle schneller als große wandern können. Zur Polymerisation der Matrix werden TEMED und APS hinzugegeben.

Beim verwendeten diskontinuierlichem System nach Lämmli wurde ein Trenngel (5 % Bisacrylamid) in die entsprechenden Glaskammern des verwendeten Systems von BioRad gegossen und mit Isopropanol überschichtet. Nach vollständiger Polymerisation des Trenngels wurde das Isopropanol entfernt und die Geloberkante mit Aqua dest. gewaschen, mit Sammelgel (10-12 % Bisacrylamid) überschichtet und ein Taschenkamm eingesetzt. Die Gele hatten eine Dicke von 1-1,5 mm und wurden nach dem Erstarren in die entsprechende Laufkammer eingesetzt. Nach dem Auftragen der Proben und Marker erfolgte die Elektrophorese im Lauf-

puffer bei 30 mA, bis die Proben das Trenngel erreicht hatten, und anschließend bei 50 mA solange, bis die Proben den unteren Gelrand erreicht hatten.

#### **3.4.5 Proteintransfer mittels Western Blot**

Bei einem Western Blot werden die Proteine der SDS-PAGE elektrophoretisch durch anlegen eines zum Gel senkrechten elektrischen Feldes auf eine Protein-bindende Nitrozellulose-Membran übertragen. Auf dieser können die immobilisierten Proteine durch spezifische Antikörperbindung sichtbar gemacht werden. Der Transfer erfolgte ausschließlich nach dem *Wet-Blot* Verfahren.

Eine Nitrozellulose-Membran wurde auf Gelgröße zugeschnitten und für 10 min in Transferpuffer inkubiert. Vier Lagen Filterpapier, jeweils zwei dünne und zwei dicke, wurden ebenfalls auf Gelgröße zugeschnitten und im Transferpuffer getränkt. Im Sandwich-Prinzip wurde eine Lage dickes Filterpapier, eine Lage dünnes Filterpapier, das Gel, die Membran und wieder jeweils eine Lage dünnes und dickes Filterpapier luftblasenfrei übereinander gelegt. Das Sandwich wurde so zwischen die beiden Elektroden einer Tank-Blot-Kammer geklemmt, dass sich die Membran auf der Anodenseite befand. Der Proteintransfer erfolgte unter Rühren, mit Kühlakku in Transferpuffer für 90 min bei 120 V oder über Nacht bei 30 V. Durch Färbung mit Ponceau S-Lösung wurde der erfolgreiche Transfer der Proteine überprüft.

#### **3.4.6 Proteindetektion**

Nachdem die Ponceau S-Färbung durch das Waschen der Membran mit Waschpuffer entfernt wurde, mussten zunächst die unspezifischen Proteinstellen mittels Blockingpuffer unter Schwenken für eine Stunde bei Raumtemperatur blockiert werden. Damit wird der Hintergrund der unspezifischen Bindung reduziert und so die Sensitivität des Western Blots erhöht. Nach standardmäßigem Waschen für 3 x 5 min wurde die Membran zur Proteindetektion mit einer geeigneten Verdünnung des antigenspezifischen, unmarkierten Primärantikörpers ü. N. bei 4°C oder für 1-2 h bei Raumtemperatur unter Schwenken inkubiert. Nachfolgend wurde die Membran gewaschen, um dann für eine Stunde bei Raumtemperatur unter Schwenken mit einem HRP-gekoppelten speziesspezifischen Sekundärantikörper zu inkubieren. Gleichzeitig wurde auch ein anti-Biotin-Konjugat zugegeben, um den Molekulargewichtsmarker bei der nachfolgenden Entwicklung sichtbar zu machen. Der Sekundärantikörper war mit einer

Peroxidase (HRP) gekoppelt, die die Oxidation von Luminol katalysiert. Die Visualisierung erfolgte mittels „Immobilon Western Chemiluminescent HRP Substrate“ im GeneGnome. Wurde die Membran für die Detektion eines weiteren Proteins benötigt, mussten die gebundenen Antikörper von der Membran gelöst werden. Dafür wurde sie zunächst gewaschen, um dann mit dem „Restore Western Blot Stripping Buffer“ für 10 min bei 42°C behandelt zu werden. Nach erneutem Waschen konnte die Membran mit einem neuen Primärantikörper inkubiert werden.

#### **3.4.7 Densitometrie und Darstellung der Western Blots**

Die einzelnen Abbildungen der Western Blots stehen beispielhaft für eine dreifache Durchführung der Versuche. Die Aussagen über die relative Zu-, bzw. Abnahme des Proteingehalts beziehen sich auf den jeweiligen Wert der Kontrolle, soweit es nicht anders angegeben ist, und wurden densitometrisch ermittelt. Dargestellt wird diese Zu-, bzw. Abnahme x-fach unter jedem Western Blot. Für die densitometrische Analyse wurde die GeneTools *analysis software* der Firma Syngene Bio Imaging verwendet.

### **3.5 Molekularbiologische Methoden**

#### **3.5.1 RNA-Isolierung**

Für die Analyse der Expression auf Transkript-Ebene musste zunächst RNA gewonnen werden. Dafür wurde das Zellpellet in 1 ml Trizol gelöst und gut gemixt, bis ein homogenes Lysat entstand. Nachdem die Proben 5 min bei Raumtemperatur inkubierten, wurden 0,2 ml Chloroform hinzugegeben, es wurde stark geschüttelt und anschließend 20 min bei 4 °C und 15.000 rpm zentrifugiert. Die wässrige Phase, die die RNA enthält, wurde nun in ein neues Röhrchen pipettiert, mit 0,6 ml Isopropanol versetzt und nach 10 min Inkubation bei Raumtemperatur erneut bei 4 °C und 15.000 rpm für 10 min zentrifugiert. Der Überstand wurde entfernt und 1 ml eiskalter 75 %iger Ethanol (angesetzt mit DEPEC-H<sub>2</sub>O) auf das Pellet gegeben. Nach gutem Mischen, wurde die Probe erneut bei 4 °C und 15.000 rpm für 5 min zentrifugiert. Nach der vorsichtigen Dekantierung des Überstandes wurde das Pellet, je nach Größe, in 50-200 µl DEPEC-H<sub>2</sub>O für 10 min bei 60 °C gelöst. Die Lagerung der RNA erfolgte bei -80 °C.

### 3.5.2 Konzentrationsbestimmung von RNA

Die Konzentration und Reinheit einer RNA-Lösung kann mit Hilfe der optischen Dichte (OD) ermittelt werden. Hierzu wurden 2 µl des RNA-Eluats mit 68 µl DEPEC-H<sub>2</sub>O verdünnt. Die Messung der verdünnten RNA-Lösung erfolgte bei einer OD von 260 nm und 280 nm in einer Quarzküvette gegen die reine Verdünnungslösung in einem Photometer. Die RNA-Konzentration wurde mittels folgender Gleichung errechnet:

$$\text{RNA-Konzentration } [\mu\text{g}/\mu\text{l}] = \text{OD}_{260\text{ nm}} * \text{Verdünnungsfaktor} * 40 \mu\text{g/ml.}$$

Der Quotient aus  $\text{OD}_{260\text{ nm}}/\text{OD}_{280\text{ nm}}$  stellt ein Maß für die Reinheit der RNA dar und sollte zwischen 1,6 und 2,0 liegen.

### 3.5.3 Reverse Transkription

Für die Durchführung einer quantitativen PCR (*Polymerase Chain Reaktion*) von RNA ist es zunächst erforderlich alle in einer Zelle vorkommenden RNA-Spezies in eine komplementäre DNA (cDNA) umzuschreiben. Mit Hilfe einer RNA-abhängigen DNA-Polymerase kann aus RNA cDNA synthetisiert werden. Dieser Prozess wird als Reverse Transkription (RT) bezeichnet. Die so entstandene cDNA dient dann in der quantitativen PCR als *Template*. Zunächst wurde die RNA in cDNA mit Hilfe des „Reverse Transcription System Kit“ der Firma Promega nach Herstellerangaben im Thermocycler umgeschrieben. Dazu wurde 1 µg RNA mit DEPEC-H<sub>2</sub>O auf 9,9 µl aufgefüllt, für 10 min bei 70 °C inkubiert und anschließend auf Eis gekühlt. Zu jedem Ansatz wurden 10,1 µl RT-Prämix hinzugefügt. Die *Primer* bestanden dabei aus einem unspezifischen Mix aus Hexanukleotiden, sogenannten *Random-Primer*. Nachfolgend sind die Zusammensetzung des Prämix und das verwendete Thermocycler Programm aufgeführt:

Tab. 3: Zusammensetzung des Prämix für die Reverse Transkription

Substanz	Menge
MgCl <sub>2</sub> , 25 mM	4 µl
Puffer für Reverse Transkriptase, 10 x	2 µl
RNAse-Inhibitor	0,5 µl
<i>Random-Primer</i>	1 µl
Nukleotid-Mix, 10 mM	2 µl
AMV-Reverse Transkriptase	1 µl

Tab. 4: Thermocycler-Programm für die Reverse Transkription

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
AMV-Aktivierung	24 °C	10 min	1
cDNA-Synthese	42 °C	15 min	1
Denaturierung	99 °C	5 min	1

### 3.5.4 Quantitative PCR

Im Anschluss an die Herstellung von cDNA erfolgte im 2. Schritt die quantitative PCR als *Real-Time* PCR im *Lightcycler*® von Roche. Diese Vorgehensweise ist zurzeit die modernste Methode der Quantifizierung von Nucleinsäuren und baut auf dem Prinzip des Fluoreszenz-Resonanz-Energie-Transfers (FRET) auf. Hierfür wurde das *Hybridization Probes*-Prinzip angewandt. Dabei werden zwei Oligonukleotide verwendet, die während des Annealings an eine innere Sequenz des zu amplifizierenden Fragments binden. Das eine Oligonukleotid ist am 3'-Ende mit einem sogenannten Donor, einem bestimmten Fluorchrom (FL) markiert. Das andere ist am 5'-Ende mit einem Akzeptor, einem zweiten Fluorchrom (LC Red640) konjugiert. Außerdem ist das 3'-Ende dieser zweiten Sonde mit einer Phosphatgruppe blockiert, damit es nicht als Primer fungieren kann. Die Oligonukleotide sind so gewählt, dass sie beide im Abstand von maximal ein bis fünf Nukleotiden an den zu amplifizierenden Strang binden. Beide Fluorochrome besitzen ein charakteristisches Exzitations- und Emissionsspektrum, wobei hier das Emissionsspektrum des Donors dem Exzitationsspektrum des Akzeptors entspricht. Durch die räumliche Nähe der beiden gebundenen Oligonukleotide ist es möglich, dass das bei Bestrahlung mit Licht frei werdende Fluoreszenzlicht des Donors das Fluorchrom des Akzeptors anregt. Das vom Akzeptor emittierte Licht kann nun gemessen werden, wobei die Signalstärke proportional zur Anzahl der DNA-Amplifikate steigt. Die Menge der PCR-Produkte kann so in Echtzeit (*Real-time*) während eines PCR-Zyklus erfasst werden, wobei nur in der exponentiellen Phase der PCR eine korrekte Quantifizierung möglich ist, da dann optimale Reaktionsbedingungen herrschen. Um eine Aussage über die Expression eines bestimmten Gens machen zu können, wird als Standard ein Haushaltsgen (*housekeeping gen*) bestimmt, von dem auszugehen ist, dass es in konstanter Menge exprimiert wird, in diesem Fall  $\beta$ 2-Micro-Globulin ( $\beta$ 2-MG). Die Auswertung

erfolgte mit Hilfe der *LightCycler*® Software Version 3.5 von Roche Diagnostics. Nachfolgend sind die Reaktionsansätze aufgeführt.

Tab. 5: Reaktionsansätze für die PCR im *LightCycler*®

<i>LightCycler</i> ®-Ansatz	β2-MG	p21	Chk1
cDNA	1 µl	1 µl	1 µl
MgCl 25 mM	2,4 µl	2,3 µl	2 µl
Primer ( <i>forward</i> ) 10 pmol/ µl	1,25 µl	1,25 µl	1,25 µl
Primer ( <i>reverse</i> ) 10 pmol/ µl	1,25 µl	1,25 µl	1,25 µl
FL-HybProbe 2 pmol µl	1 µl	1 µl	1 µl
LC Red640-HybProbe 2 pmol/ µl	2 µl	2 µl	2 µl
Fast –Start-Master-Mix	2,2 µl	2,2 µl	2,2 µl
Aqua bidest	8,9 µl	9 µl	9,3 µl

Die Reaktionsgefäße waren in diesem Fall 20 µl Glaskapillaren, die nach dem Befüllen zentrifugiert wurden (1000 rpm, 1 min). Je ein Reaktionsansatz ohne DNA diente als Negativkontrolle. Die Amplifikation des jeweiligen Genabschnitts erfolgte in den nachfolgend aufgeführten PCR-Programmen.

Tab. 6: *LightCycler*®-Programm für Chk1

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Denaturation	95 °C	10 min	1
Amplifikation	95 °C	10 s	45
	56 °C	10 s	
	72 °C	7 s	
<i>Cooling</i>	40 °C	30 s	1

Tab. 7: *LightCycler*®-Programm für β2-MG

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Denaturation	95°C	10 min	1
Amplifikation	95°C	10 s	45
	53°C	10 s	
	72°C	11 s	
<i>Cooling</i>	40°C	30 s	1

Tab. 8: *LightCycler*®-Programm für p21

Schritt	Temperatur	Dauer	Zyklen
Denaturation	95°C	30 s	1
Amplifikation	95°C	0 s	45
	62°C	10 s	
	72°C	9 s	
<i>Cooling</i>	40°C	30 s	1

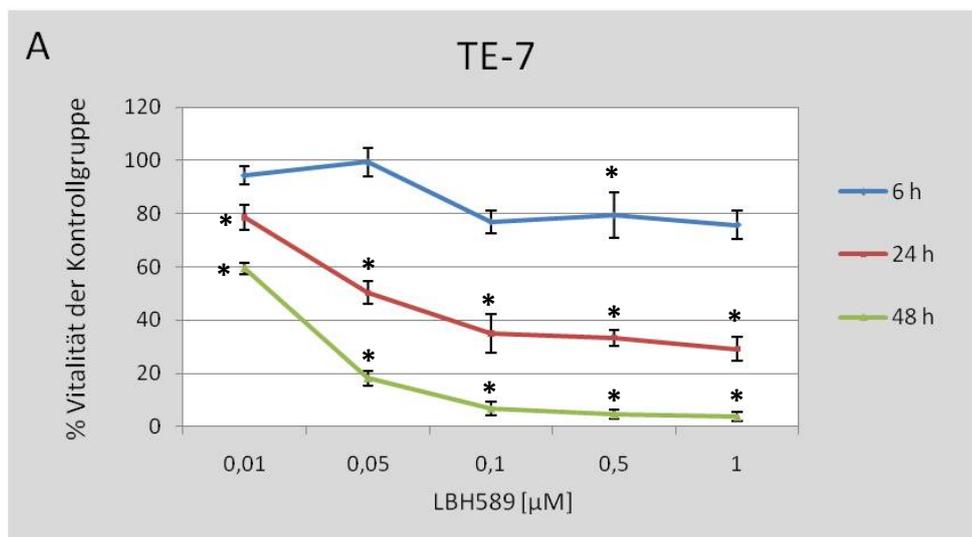
### 3.6 Statistische Analyse

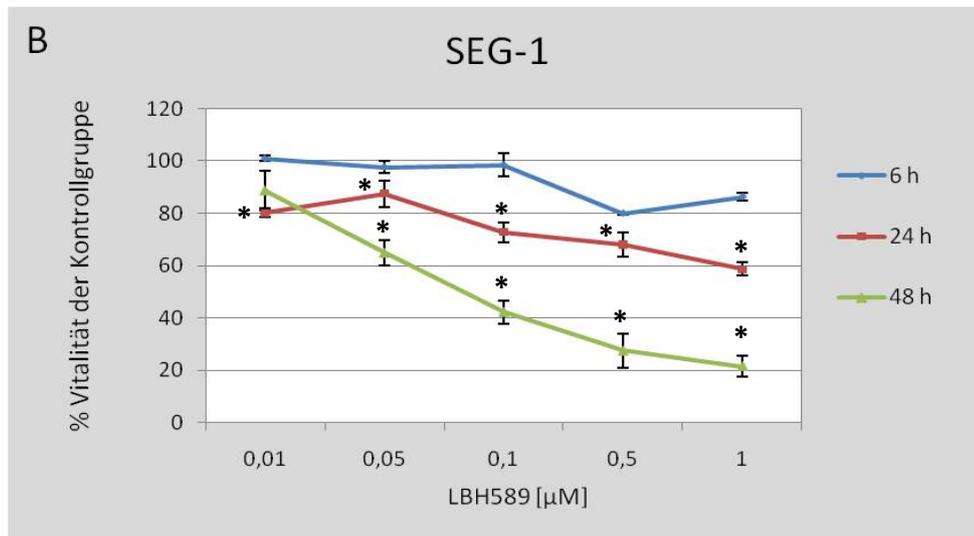
Die erhobenen Daten wurden in einer Office Access 2007 (Microsoft) Datenbank archiviert. Von jeder Datenreihe wurden die Mittelwerte mit Standardabweichung erhoben. Die statistische Auswertung erfolgte mit Hilfe der Statistikfunktion von Microsoft Excel 2007. Vergleiche auf signifikante Unterschiede zwischen den Gruppen wurde mit dem Standard-T-Test durchgeführt. Bei einem  $p < 0,05$  wurden Unterschiede als signifikant gewertet.

## 4 Ergebnisse

### 4.1 Bestimmung der Zellvitalität der Zelllinien TE-7 und SEG-1 unter der Behandlung mit dem Histondeacetylase-Inhibitor LBH589

Im ersten Schritt dieser Studie musste eine geeignete Behandlungskonzentration des Histondeacetylase-Inhibitors (HDACI) LBH589 ermittelt werden. Es wurden die Konzentrationen 0,01  $\mu\text{M}$ , 0,05  $\mu\text{M}$ , 0,1  $\mu\text{M}$ , 0,5  $\mu\text{M}$  und 1  $\mu\text{M}$  auf ihren Einfluss auf die Zellvitalität der beiden Zelllinien TE-7 und SEG-1 getestet (siehe 3.2). Die Behandlungsdauer erstreckte sich über 6 h, 24 h und 48 h. Es wurden jeweils Sechsfach-Bestimmungen in drei unabhängigen Ansätzen angefertigt.





**Abb. 4.1 Konzentrationsabhängige Wirkung des HDACI LBH589 auf die Vitalität der Zelllinie TE-7 (A) und SEG-1 (B).** Die Zellen wurden für 6 h, 24 h und 48 h jeweils mit den fünf verschiedenen LBH589-Konzentrationen 0,01 μM, 0,05 μM, 0,1 μM, 0,5 μM und 1 μM inkubiert. Eine unbehandelte Kontrollgruppe wurde bei jeder Versuchsreihe mitgeführt. Die Abbildung zeigt die Mittelwerte und die Standardabweichung aus drei von einander unabhängigen Versuchen, die in das Verhältnis zu denen der Kontrollgruppe gesetzt wurden. \* Signifikanz ( $p < 0,05$ ) vorhanden.

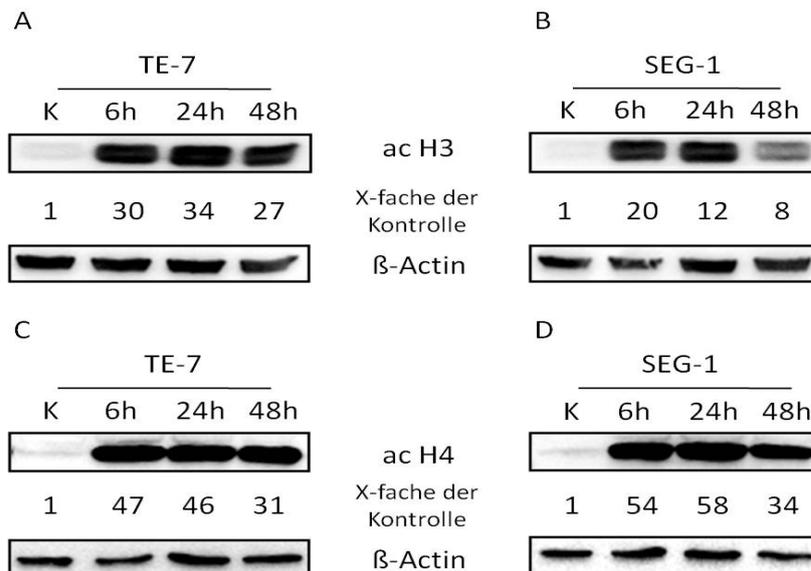
Die Ergebnisse des MTT-Assays zeigen, dass der HDACI LBH589 einen konzentrations- und zeitabhängigen Einfluss auf die Vitalität der Zelllinien TE-7 und SEG-1 hat. Das Ausmaß des Einflusses ist zwischen den Zelllinien jedoch unterschiedlich. Nach 6 h Behandlungsdauer finden sich bei der Zelllinie SEG-1 keine signifikanten Unterschiede in der Zellvitalität im Vergleich zu der Kontrollgruppe, ebenso nach 48 h mit der LBH-Konzentration von 0,01 μM. Die Zelllinie TE-7 zeigt ebenfalls nach sechsständiger Behandlungsdauer keine signifikante Auswirkung auf die Zellvitalität, außer unter der LBH-Konzentration 0,5 μM. Mit zunehmender Wirkdauer werden Unterschiede zwischen den zwei Zelllinien deutlicher, die Ergebnisse sind nun durchgehend als signifikant zu werten. Während SEG-1 nach 24 h bei 0,5 μM 68 % vitale Zellen und bei 1 μM 58,7 % vitale Zellen aufweist, erreicht die Vitalität von TE-7 bereits bei der Konzentration von 0,05 μM die 50 %-Marke. Mit zunehmender Konzentration geht der Abwärtstrend weiter: Bei 0,1 μM sind 35 % der TE-7-Zellen vital, bei 0,5 μM sind es 33,4 % und bei 1 μM 29 %. Somit lässt sich festhalten, dass bei einer Konzentration von 1 μM und 24 h Behandlungszeit bei der Zelllinie SEG-1 etwa doppelt so viele Zellen vital sind (58,7 %), wie bei der Zelllinie TE-7 (29 %). Nach 48 h nimmt der Anteil lebender Zellen beider Zelllinien weiter ab. SEG-1 kommt bei 0,1

$\mu\text{M}$  mit 42 % vitalen Zellen das erste Mal unter die 50 %-Marke, bei 0,5  $\mu\text{M}$  sind es 27,5 % und bei 1  $\mu\text{M}$  schließlich noch 21,6 % vitale Zellen. Die Zelllinie TE-7 erreicht bei der niedrigsten Konzentration von 0,01  $\mu\text{M}$  59,6 % Vitalität der Kontrollgruppe, bei 0,05  $\mu\text{M}$  sind es 18,2 %, bei 0,1  $\mu\text{M}$  6,8 % und bei 1  $\mu\text{M}$  schließlich 3,6 %. Es lässt sich somit festhalten, ab der Konzentration von 0,1  $\mu\text{M}$  liegt die Zellvitalität der Linie TE-7 nach 48 h Behandlungsdauer unter 10 %. Für die Fragestellung dieser Studie, die Charakterisierung von apoptoseassoziierten Signalmolekülen, sind Zellkulturen mit einem so hohen Anteil an letalen Zellen nicht verwertbar. Die LBH589-Konzentration von 0,05  $\mu\text{M}$  wurde somit als Behandlungskonzentration für diese Studie festgelegt, weil sie signifikant Einfluss auf die Vitalität beider Zelllinien nimmt, aber ohne eine zu ausgeprägte Letalität zu bewirken.

### **4.2 Charakterisierung des Proteinexpressionsmusters der Zelllinien TE-7 und SEG-1 unter der Behandlung mit LBH589**

Nachdem die Konzentration des Histondeacetylase-Inhibitors LBH589 von 0,05  $\mu\text{M}$  als eine optimale Behandlungskonzentration ermittelt wurde, wurden erneut Zellen beider Zelllinien für 6 h, 24 h und 48 h mit LBH589 behandelt (siehe 3.1.3). Das gewonnene Material diente der Untersuchung der Proteinexpressionsmuster der beiden Zelllinien unter Einfluss der LBH589-Behandlung. Im Sinne der Fragestellung wurden vorwiegend solche Proteine untersucht, die im Zusammenhang mit der Apoptose und der Zellzykluskontrolle stehen.

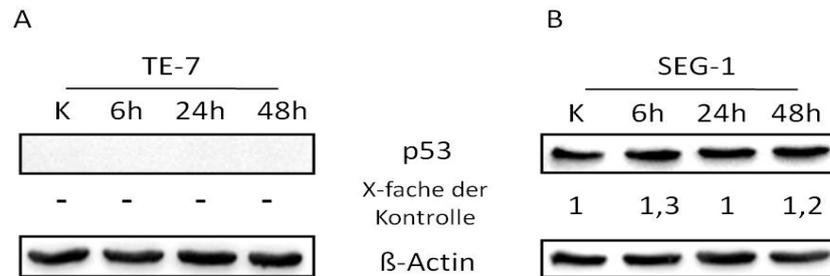
Die Wirksamkeit des Histondeacetylase-Inhibitors LBH589 wurde über den Nachweis des Anstieges von acetyliertem Histon H3 und H4 unter LBH589-Behandlung bewiesen.



**Abb. 4.2 Effekt des HDACI LBH589 auf den Acetylierungsstatus der Histone H3 (A + B) und H4 (C + D) in den Zelllinien TE-7 (A + C) und SEG-1 (B + D).** Die Zellen wurden für 6 h, 24 h und 48 h mit 0,05  $\mu$ M LBH589 behandelt. K entspricht der unbehandelten Kontrolle. Das ubiquitär exprimierte  $\beta$ -Actin dient als Mengenkontrolle des Gesamtproteins.

Unter dem Einfluss von LBH589 kommt es in beiden Zelllinien zu einer massiven Induktion von acetyliertem Histon H3 und H4. In den unbehandelten Kontrollen ist eine sehr geringe Menge dieser Proteine nachweisbar. Unter der Behandlung mit LBH589 ist bereits nach 6 h in TE-7 das 30-fache und in SEG-1 das 20-fache an acetyliertem Histon H3 im Vergleich zum Gehalt der Kontrolle messbar. Der Proteingehalt des acetylierten Histons H4 nimmt nach 6 h in TE-7 um das 47-fache und in SEG-1 um das 54-fache der Kontrolle zu. In TE-7 bleiben diese Mengen bis 24 h annähernd konstant und fallen nach 48 h auf das 27-fache (ac H3) und auf das 31-fache (ac H4) des Proteingehalts der Kontrolle ab. In der Zelllinie SEG-1, kann man bei 48 h eine Abnahme an acetyliertem Histon H3 auf das achtfache und von acetyliertem Histon H4 auf das 34-fache der Kontrolle feststellen.

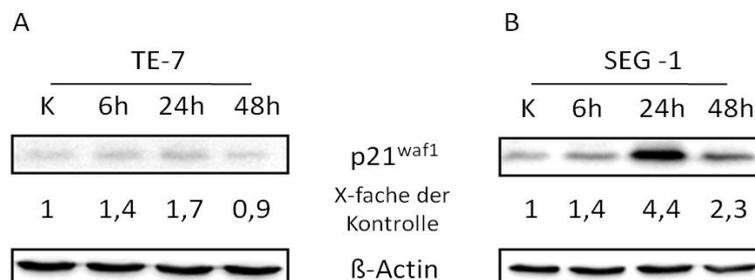
Des Weiteren wurden die Zelllinien auf ihr Expressionsmuster des Tumorsuppressorgens p53 untersucht. Wie bereits erwähnt, handelt es sich bei SEG-1 um eine p53-Wildtyp Zelllinie, TE-7 dagegen zeigt einen Verlust des p53-Gens (siehe auch 3.1.1).



**Abb. 4.3. Einfluss des HDACi LBH589 auf die p53-Proteinexpression der Zelllinien TE-7 (A) und SEG-1 (B).** Die Zellen wurden über 6 h, 24 h und 48 h mit 0,05  $\mu$ M LBH589 behandelt. K entspricht der unbehandelten Kontrolle. Das ubiquitär exprimierte  $\beta$ -Actin dient als Mengenkontrolle des Gesamtproteins.

Der Verlust des p53-Proteins in der Zelllinie TE-7 ist deutlich sichtbar. Weder in der unbehandelten Kontrolle, noch unter LBH589-Einfluss gelingt ein Nachweis des Tumorsuppressorproteins. In der Zelllinie SEG-1 dagegen ist bereits in der Kontrolle p53 eindeutig nachweisbar. Nach 48 h Behandlungszeit mit 0,05  $\mu$ M LBH589 nimmt die Menge an p53 um ein Fünftel im Vergleich zur Kontrolle zu.

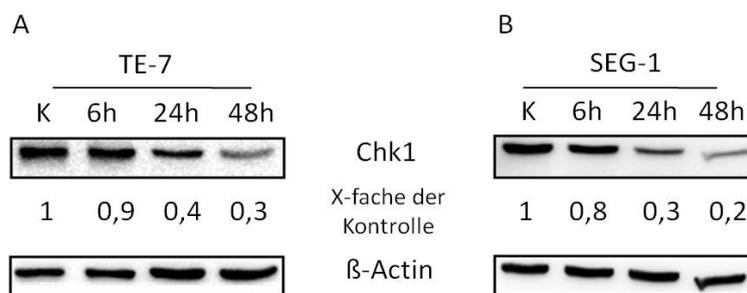
Als weiteres Protein wurde der CDK-Inhibitor p21<sup>waf1</sup> untersucht, der im engen Kontext zum Tumorsuppressorgen p53 steht und Einfluss auf Zellzyklus und Apoptose nimmt.



**Abb. 4.4 Einfluss des HDACi LBH589 auf die p21<sup>waf1</sup>-Proteinexpression der Zelllinien TE-7 (A) und SEG-1 (B).** Die Zellen wurden über 6 h, 24 h und 48 h mit 0,05  $\mu$ M LBH589 behandelt. K entspricht der unbehandelten Kontrolle. Das ubiquitär exprimierte  $\beta$ -Actin dient als Mengenkontrolle des Gesamtproteins.

In der Zelllinie TE-7 kann eine sehr schwach ausgeprägte Expression des p21<sup>waf1</sup>-Proteins nachgewiesen werden. Das Maximum der Proteinexpression wird nach 24 h LBH-Behandlung mit einem Anstieg um 70 % erreicht. Nach 48 h werden 90 % der Kontroll-Proteinmenge exprimiert. In der Zelllinie SEG-1 findet sich in der Kontrolle eine geringe Expression des Cdk-Inhibitors p21<sup>waf1</sup>. Mit Einsetzen der HDACI-Behandlung steigert sich die Menge des p21<sup>waf1</sup>-Proteins auf das 1,4-fache der Kontrolle. Nach weiteren 18 h wird die maximale Expression mit dem 4,4-fachen der Kontrolle erreicht. Danach sinkt die Konzentration wieder ab, so dass nach 48 h die Expression des p21<sup>waf1</sup>-Proteins auf das 2,3-fache der Kontrolle abfällt.

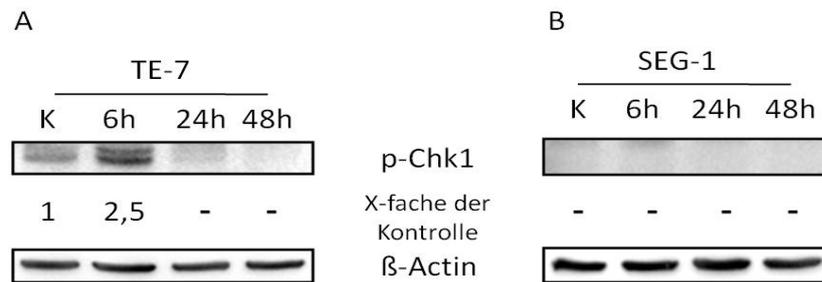
Die Untersuchung der Checkpointkinase 1 (Chk1), ein wichtiges Regulatorprotein des Zellzyklus, führte zu folgendem Ergebnis.



**Abb. 4.5 Einfluss des HDACI LBH589 auf den Chk1-Proteingehalt der Zelllinien TE-7 (A) und SEG-1 (B).** Die Zellen wurden über 6 h, 24 h und 48 h mit 0,05  $\mu$ M LBH589 behandelt. K entspricht der unbehandelten Kontrolle. Das ubiquitär exprimierte  $\beta$ -Actin dient als Mengenkontrolle des Gesamtproteins. Das Molekulargewicht von Chk1 liegt bei 56 kDa.

In beiden Zelllinien kommt es zu einer Abnahme der Chk1-Proteinkonzentration. In der Zelllinie TE-7 nimmt die Proteinbande bei 56 kDa auf folgende Weise ab: Bei 6 h finden sich 90 % der Kontrolle, bei 24 h 40 % und nach 48h sind noch 30 % der Kontrolle nachweisbar. In der Zelllinie SEG-1 kommt es ebenfalls zu einer Abnahme der Chk1-Konzentration, die nach 6 h LBH589-Behandlung sichtbar bei 80 % der Kontrolle liegt. Nach 24 h finden sich 30 % der Kontrolle, nach 48 h noch 20 %.

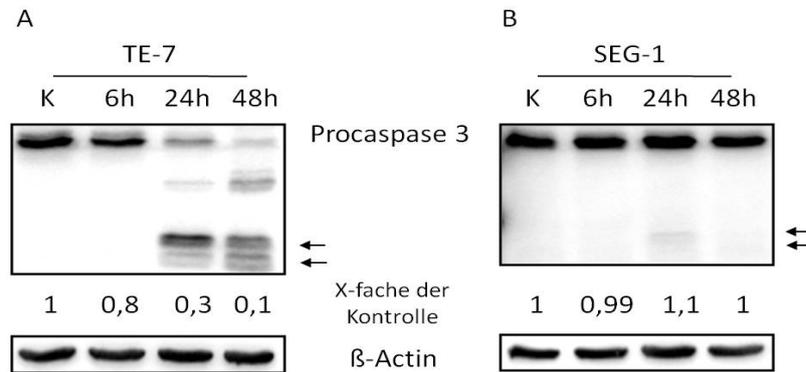
Bei der Analyse der phosphorylierten und damit aktivierten Form der Checkpointkinase 1 (p-Chk1) zeigen sich deutliche Unterschiede zwischen den Zelllinien TE-7 und SEG-1.



**Abb. 4.6 Einfluss des HDACI LBH589 auf den p-Chk1-Proteingehalt der Zelllinien TE-7 (A) und SEG-1 (B).** Die Zellen wurden über 6 h, 24 h und 48 h mit 0,05  $\mu$ M LBH589 behandelt. K entspricht der unbehandelten Kontrolle. Das ubiquitär exprimierte  $\beta$ -Actin dient als Mengenkontrolle des Gesamtproteins.

In der Zelllinie SEG-1 ist keine phosphorylierte Checkpointkinase 1 nachweisbar. Weder in der Kontrolle noch unter LBH589-Behandlung konnte densitometrisch ein Proteingehalt ermittelt werden. Dagegen findet sich in TE-7 aktivierte Checkpointkinase 1 (p-Chk1) in der Kontrolle und am stärksten nachweisbar nach 6 h LBH589-Behandlung (2,5-fache der Kontrolle). Nach 24 h nimmt die Konzentration so stark ab, dass kein p-Chk1 densitometrisch mehr nachweisbar ist.

Die Voraussetzung für die Aktivierung der Effektorcaspase 3 ist, wie für alle Caspasen, die Spaltung der inaktiven Procaspase in ihre aktiven Untereinheiten. Die Suche nach diesen aktiven Spaltprodukten in den Zelllinien TE-7 und SEG-1 unter LBH589-Behandlung führte zu folgenden Ergebnissen.



**Abb. 4.7 Einfluss des HDACI LBH589 auf die Aktivierung der Caspase 3 in den Zelllinien TE-7 (A) und SEG-1 (B).** Die Zellen wurden über 6 h, 24 h und 48 h mit 0,05  $\mu$ M LBH589 behandelt. K entspricht der unbehandelten Kontrolle. Das ubiquitär exprimierte  $\beta$ -Actin dient als Mengenkontrolle des Gesamtproteins. Die Procaspase 3 hat ein Molekulargewicht von 35 kDa, das der Spaltprodukte (siehe Pfeile) liegt bei 19 und 17 kDa.

Unter der LBH589-Behandlung zeigt sich eine deutliche Spaltung und damit Aktivierung der Procaspase 3 in der Zelllinie TE-7. Ab dem 24-h-Wert sind die Banden der Spaltprodukte gut sichtbar. Gleichzeitig nimmt die Konzentration der Procaspase stark ab, nämlich auf 30 % der Kontrolle. Bei 48 h setzt sich dieser Trend weiter fort (10 % der Kontrolle). In der Zelllinie SEG-1 ist dagegen kaum eine Aktivierung der Caspase 3 nachweisbar. Die Konzentration bleibt unter sechsständiger LBH589-Behandlung nahezu konstant (99 % der Kontrolle) und steigt nach 24 h und 48 h um 10 % an. Nach 24 h ist eine sehr schwache Bande bei 19 kDa densitometrisch messbar. Offensichtlich kommt es in dieser Zelllinie zu keiner Apoptose-Induktion oder die Apoptose verläuft Caspase 3 unabhängig

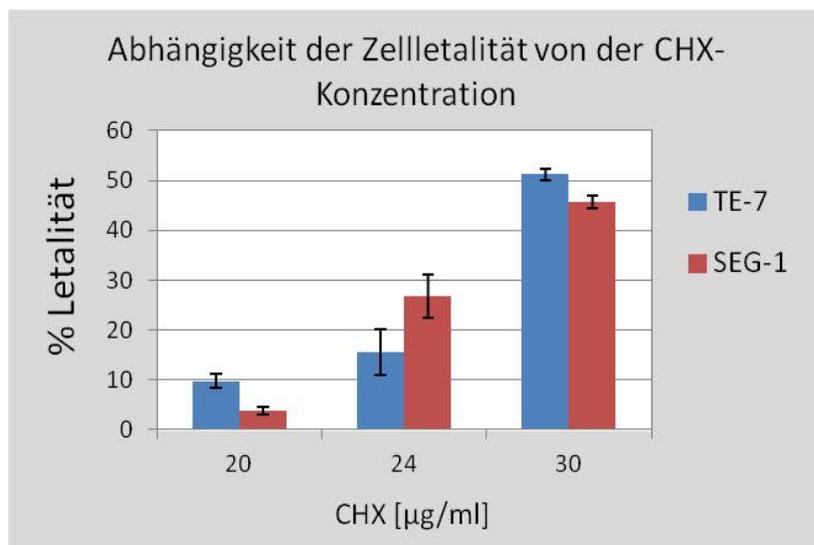
### 4.3 Analyse der LBH589 induzierten Herunterregulation der Checkpointkinase 1 in den Zelllinien TE-7 und SEG-1

Bei der Untersuchung der Proteinexpression der beiden Zelllinien unter Einfluss der LBH589-Behandlung zeigt sich eine Konzentrationsabnahme der Checkpointkinase 1. Im nächsten Schritt soll untersucht werden, in wie fern dieser Verlauf auf eine Beteiligung des Proteasoms zurückzuführen ist. Dafür wurden die Zellen mit dem Translationsinhibitor Cycloheximid (CHX) behandelt. Über die Suppression der Proteinsynthese kann untersucht werden, ob es unter der LBH589-Behandlung zu einer beschleunigten Abnahme des Chk1-Proteingehalts, im Vergleich

zu der unbehandelten Kontrollgruppe, kommt. Im zweiten Schritt soll mit dem Proteasominhibitor MG-132 überprüft werden, ob ein beschleunigter Abbau ggfls. proteasomabhängig erfolgt.

#### 4.3.1 Effekt des Translationsinhibitors Cycloheximid auf die Proteinkonzentration der Checkpointkinase 1 unter LBH589-Behandlung

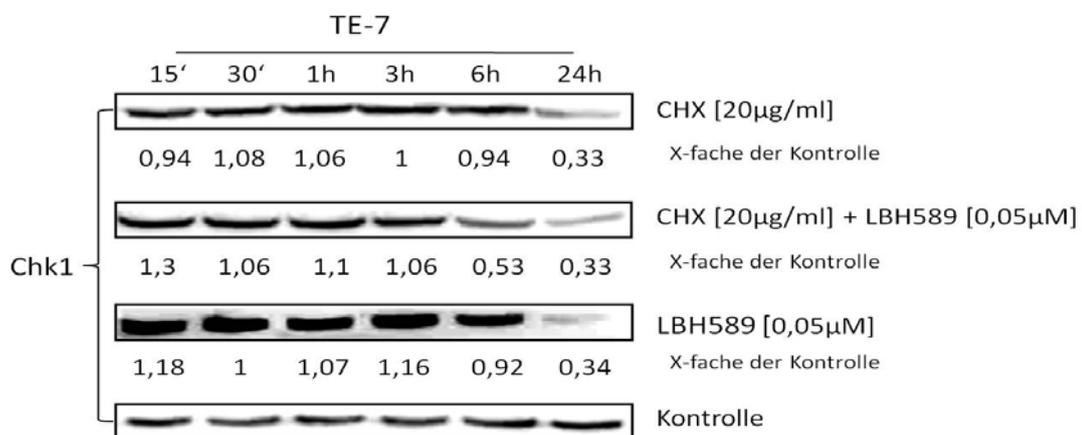
In der Literatur liegt keine Erfahrung darüber vor, welche CHX-Konzentration für die Zelllinien TE-7 und SEG-1 toxisch ist. Daher erfolgte zuerst eine Analyse der Zellvitalität in Abhängigkeit von der CHX-Konzentration mittels der Trypanblaumethode (siehe 3.1.5). Es wurden die Konzentrationen 20, 24 und 30  $\mu\text{g/ml}$  über eine Dauer von 24 h auf ihre Wirkung getestet (siehe 3.1.3). Das CHX sollte nicht mehr als 10 % letale Zellen in einem Ansatz provozieren. Die Ergebnisse sind folgendermaßen.



**Abb. 4.8 Konzentrationsabhängiger Effekt des Translationsinhibitors CHX auf die Zellletalität der Zelllinien TE-7 und SEG-1.** Die Zellen wurden mit den CHX-Konzentrationen 20  $\mu\text{g/ml}$ , 24  $\mu\text{g/ml}$  und 30  $\mu\text{g/ml}$  über 24 h behandelt. Danach erfolgte die Analyse der Zellvitalität mit Hilfe der Trypanblaumethode. Hierzu wurden die Gesamtzahl der Zellen und die Anzahl der gefärbten (letalen) Zellen bestimmt. Der Prozentsatz der gefärbten Zellen entspricht dem Anteil letaler Zellen. Die Werte entsprechen den Mittelwerten und der Standardabweichung aus mind. zwei unabhängigen Versuchsansätzen.

In der Abbildung ist deutlich zu sehen, dass nur die Konzentration von 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  die Anforderung erfüllt, weniger als 10 % letale Zellen nach der 24stündigen CHX-Behandlung zu provozieren. Das gilt für die Zelllinie TE-7 mit 9,8 % so wie für SEG-1 mit 3,8 % toter Zellen.

Als nächstes wurden beide Zelllinien mit 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  CHX behandelt (siehe 3.1.3). Dies geschah über die Zeiträume 15 min, 30 min, 1 h, 3 h, 6 h und 24 h. Außerdem wurden drei weitere Versuchsansätze mitgeführt: Eine unbehandelte Kontrollgruppe, ein Ansatz mit CHX und 0,05  $\mu\text{M}$  LBH589 und ein Ansatz, der nur den HDACI LBH589 enthielt. Die dargestellten Ergebnisse entsprechen übereinstimmenden Resultaten aus mind. zwei unabhängigen Versuchsansätzen.

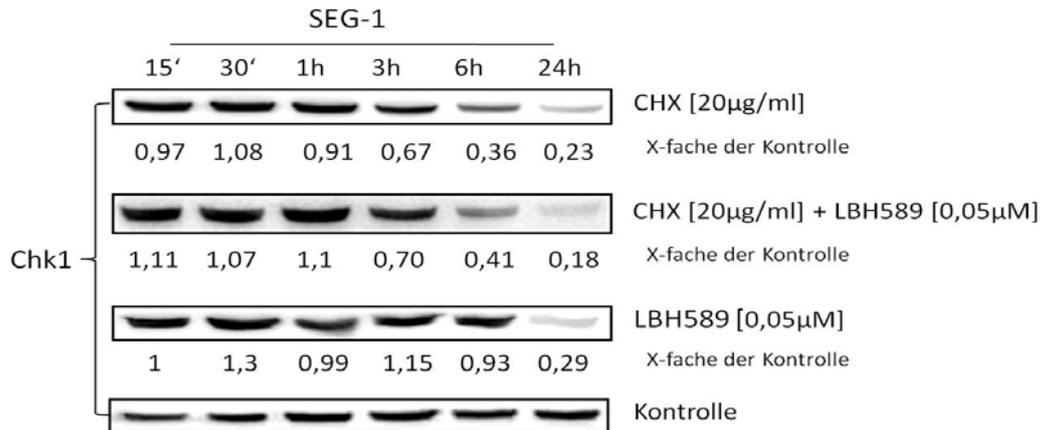


**Abb. 4.9 Effekt des Translationsinhibitors CHX auf die Konzentration des Chk1-Proteins der Zelllinie TE-7 unter LBH589-Behandlung.** Die Zellen wurden für jeweils 15 min, 30 min, 1 h, 3 h, 6 h und 24 h mit den angegebenen Substanzen inkubiert. CHX wurde in einer Konzentration von 20  $\mu\text{g}/\text{ml}$  eingesetzt, LBH589 mit 0,05  $\mu\text{M}$ . Die Kontrolle entspricht einer unbehandelten Kontrollgruppe. Untersucht wurde das Protein Checkpointkinase 1. Die Mengenkontrolle des Gesamtproteins verlief in diesem Versuch nicht über  $\beta$ -Actin, sondern über das Einsetzen gleicher Zellzahlen während der Zellpelletgewinnung (siehe auch 3.1.4).

Unter dem Einfluss des Translationsinhibitors CHX kommt es nach 24 h zu einer deutlichen Abnahme in der Chk1-Konzentration auf 33 % der Kontrolle. Bis zu diesem Zeitpunkt ist die Proteinkonzentration annähernd konstant. Unter der zusätzlichen Wirkung des LBH589 ist bereits nach 6 h eine Abnahme in der Proteinmenge auf 53 % der Kontrolle zu erkennen. Es kommt also LBH589-abhängig zu einer Verkürzung der Halbwertszeit von Chk1 unter Translationsinhibition. Im Gegensatz dazu der alleinige Effekt des LBH589 auf die Chk1-Konzentration. Wie auch unter 4.2 dargestellt, setzt hier eine deutliche Abnahme nach 24 h ein. Es ist deutlich

die Reduzierung der Chk1-Proteinbande auf 34 % im Western Blot sichtbar. Die Kontrolle zeigt, dass die Phänomene auf die Substanzwirkungen zurück zu führen sind.

Mit der Zelllinie SEG-1 wurde in der gleichen Weise verfahren. Nachfolgend sind die Ergebnisse dargestellt.



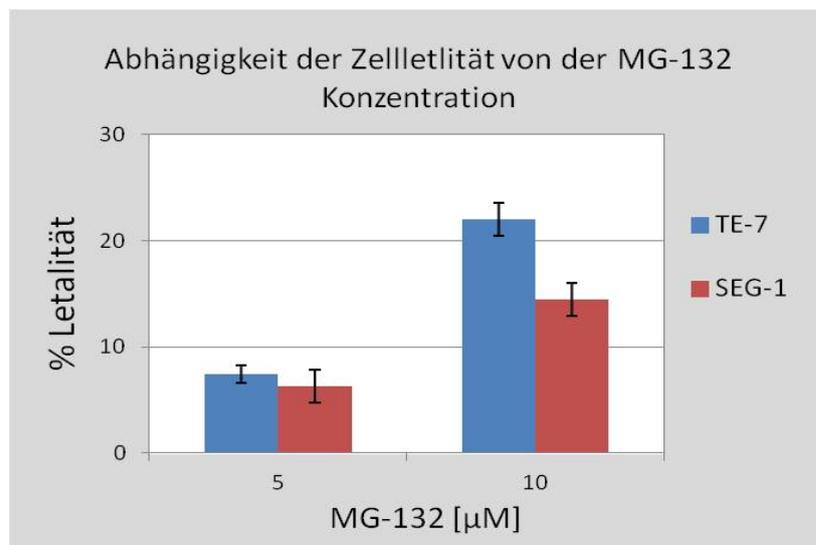
**Abb. 4.10 Effekt des Translationsinhibitors CHX auf die Konzentration des Chk1-Proteins der Zelllinie SEG-1 unter LBH589-Behandlung.** Die Zellen wurden für jeweils 15 min, 30 min, 1 h, 3 h, 6 h und 24 h mit den angegebenen Substanzen inkubiert. CHX wurde in einer Konzentration von 20 µg/ml eingesetzt, LBH589 mit 0,05 µM. Die Kontrolle entspricht einer unbehandelten Kontrollgruppe. Untersucht wurde das Protein Checkpointkinase 1. Die Mengenkontrolle des Gesamtproteins verlief in diesem Versuch nicht über  $\beta$ -Actin, sondern über das Einsetzen gleicher Zellzahlen während der Zellpelletgewinnung (siehe 3.1.4).

Unter der Suppression der Proteinbiosynthese verhalten sich die Zellen jeweils mit und ohne LBH589-Applikation sehr ähnlich. Bis einschließlich zum 1 h-Wert entspricht in beiden Versuchsansätzen die Chk1-Proteinmenge annähernd 100% der Kontrolle. Nach 3 h Behandlung sinkt der Chk1-Gehalt wieder gleichwertig ab. In der CHX-behandelten Gruppe auf 67%, in der CHX- und LBH589-behandelten Gruppe auf 70 % der Kontrolle. Zur weiterhin gleichförmigen Abnahme der Proteinkonzentration kommt es nach 6h Wirkdauer: Auf 36 % der Kontrolle unter CHX-Behandlung und auf 41 % unter der kombinierten Behandlung von CHX und LBH589. Somit nimmt LBH589 in der Zelllinie SEG-1 keinen Einfluss auf die Halbwertszeit von Chk1 unter Translationsinhibition. Der alleinige Einfluss von LBH589 führt in Übereinstimmung mit den Ergebnissen von 4.2 zu einer sichtbaren Reduzierung der Chk1-Bande nach 24 h Behandlungs-

dauer auf 29 % der Kontrolle. Die unbehandelte Kontrollgruppe zeigt hier ebenfalls, dass die Phänomene auf die Substanzwirkungen zurück zu führen sind.

#### 4.3.2 Effekt des Proteasominhibitors MG-132 auf die Proteinkonzentration der Checkpointkinase 1 unter LBH589-Behandlung

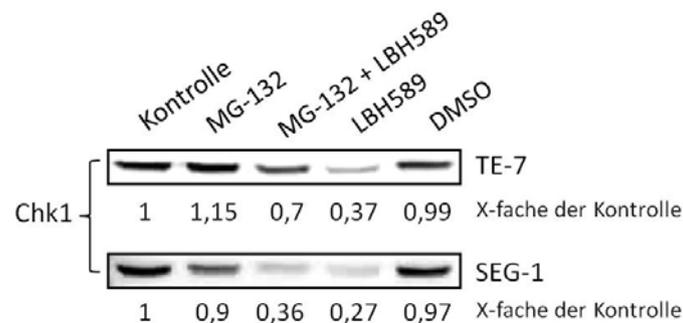
Um zu überprüfen, ob das unter 4.3.1 dargestellte Phänomen des beschleunigten Chk1-Abbaus unter LBH-Behandlung proteasomabhängig verläuft, wurden beide Zelllinien über 24 h mit dem Proteasominhibitor MG-132 inkubiert (siehe 3.1.3). Die Wirkung des LBH589, der beschleunigte Abbau des Chk1-Proteins, müsste in diesem Fall unter Einfluss des Proteasominhibitors aufgehoben werden. Jedoch musste auch hier zunächst eine geeignete Konzentration des Proteasominhibitors MG-132 ermittelt werden. Es wurden die Konzentrationen 5  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  MG-132 auf ihren Einfluss auf die Zellletalität getestet (siehe 3.1.3).



**Abb. 4.11 Konzentrationsabhängiger Effekt des Proteasominhibitors MG-132 auf die Zellletalität der Zelllinien TE-7 und SEG-1.** Die Zellen wurden mit den MG-132 Konzentrationen 5  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  über 24 h behandelt. Danach erfolgte die Analyse der Zellvitalität mit Hilfe der Trypanblaumethode. Hierzu wurden die Gesamtzahl der Zellen und die Anzahl der gefärbten (letal) Zellen bestimmt. Der Prozentsatz der gefärbten Zellen entspricht dem Anteil letaler Zellen. Die Werte entsprechen den Mittelwerten aus mind. zwei unabhängigen Versuchsansätzen mit der einfachen Standardabweichung.

Auch hier galt, dass über 90 % der Zellen die Behandlungsdauer vital überstehen mussten. Deshalb wurde im weiteren Verlauf mit der Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  gearbeitet, da hier eine Letalität von 7,4 % bei TE-7 und von 6,3 % bei SEG-1 erreicht wurde.

Beide Zelllinien wurden über 24 h mit 5  $\mu\text{M}$  MG-132 behandelt. Außerdem liefen je eine Kontrolle, ein Ansatz mit der Kombination aus 5  $\mu\text{M}$  MG-132 und 0,05  $\mu\text{M}$  LBH589, eine isoliert LBH589-Behandlung und ein Ansatz mit DMSO parallel mit. Im Folgenden sind die Ergebnisse dargestellt.



**Abb. 4.12 Effekt des Proteasominhibitors MG-132 auf die Konzentration des Chk1-Proteins der Zelllinien TE-7 und SEG-1 unter LBH589-Behandlung nach 24h.** Die Zellen wurden für 24 h mit den jeweiligen Substanzen, bzw. Substanzkombinationen behandelt. Dabei betrug die Konzentration des MG-132 5  $\mu\text{M}$  und die des LBH589 0,05  $\mu\text{M}$ . Das DMSO wurde in der gleichen Menge, wie das MG-132 verabreicht. Die Kontrolle entspricht einer unbehandelten Kontrollgruppe. Untersucht wurde das Protein Checkpointkinase 1. Die Mengenkontrolle des Gesamtproteins verlief in diesem Versuch nicht über  $\beta$ -Actin, sondern über das Einsetzen gleicher Zellzahlen während der Zellpelletgewinnung (siehe 3.1.4).

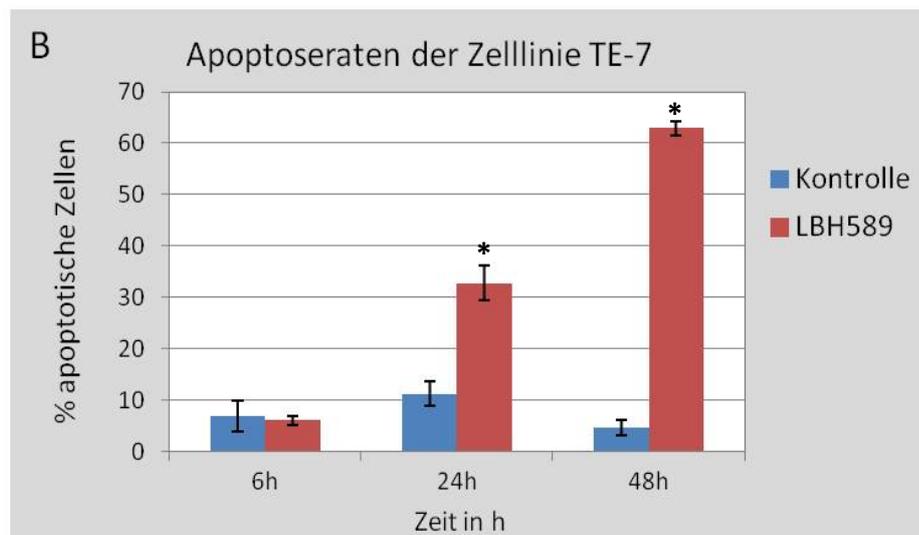
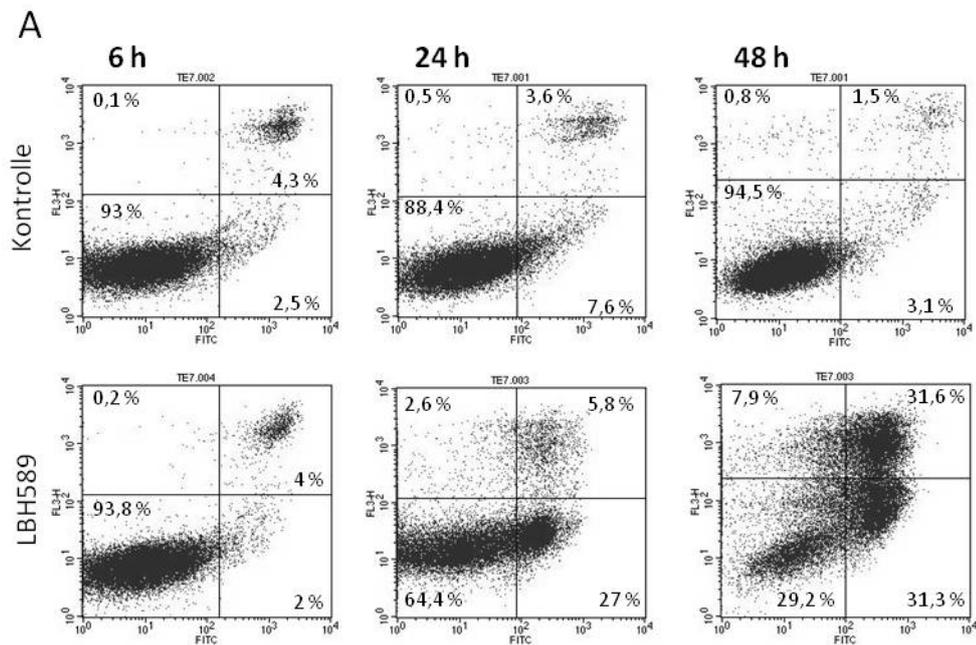
Unter der isolierten LBH589-Behandlung kommt es in beiden Zelllinien zu einer deutlichen Abnahme in der Chk1-Proteinkonzentration (in TE-7 auf 37 %, in SEG-1 auf 27 % der Kontrolle). In TE-7 hat die Chk1-Bande unter der kombinierten Behandlung von MG-132 und LBH589 eine Stärke von 70 % der Kontrolle und ist somit deutlich ausgeprägter als unter dem alleinigen Einfluss von LBH589 (37 % der Kontrolle). Die Behandlung mit MG-132 führt in TE-7 zu einem Anstieg um 10 % des Proteingehalts der Kontrolle. Unter der Behandlung mit DMSO kann eine Abnahme um 1 % verzeichnet werden, so dass davon aus zu gehen ist, dass diese Substanz keinen Einfluss auf den Chk1-Proteingehalt nimmt. Ähnlich verhält es sich in der Zelllinie SEG-

1, wo unter DMSO-Einfluss Chk1 auf 97 % des Kontroll-Proteingehalts sinkt. Unter dem Einfluss von MG-132 kommt es zu einer Abnahme auf 95 %. Im Gegensatz zur Zelllinie TE-7 führt die gleichzeitige Behandlung mit MG-132 und LBH589 in SEG-1 nicht zu einer Zunahme an Chk1-Protein (Abfall der Chk1-Konzentration auf 36 % der Kontrolle).

#### **4.4 Einfluss von LBH589 auf das Apoptoseverhalten der Zelllinien TE-7 und SEG-1**

##### **4.4.1 Untersuchung der Apoptoseraten mittels Durchflusszytometrie**

Die Zelllinien TE-7 und SEG-1 wurden hinsichtlich ihres Apoptoseverhaltens unter LBH589-Behandlung mit Hilfe der Durchflusszytometrie untersucht. Hierbei wird sich die Eigenschaft apoptotischer Zellen zu Nutze gemacht, das Membranlipid Phosphatidylserin von der Innenseite auf die Außenseite der Zellmembran zu translozieren. Es wurden mind. zwei unabhängige Versuchsansätze durchgeführt. Im Folgenden sind die Ergebnisse zum einen beispielhaft in Form von Dotplots dargestellt, zum anderen sind die Mittelwerte mit Standardabweichung sämtlicher Messungen in Diagrammform dargestellt. Die Apoptoserate bildet sich aus der Summe der Annexin-V-positiven (*lower right*) und Annexin-V und Propidiumiodid-positiven (*upper right*) Zellen (siehe auch 3.3.2).

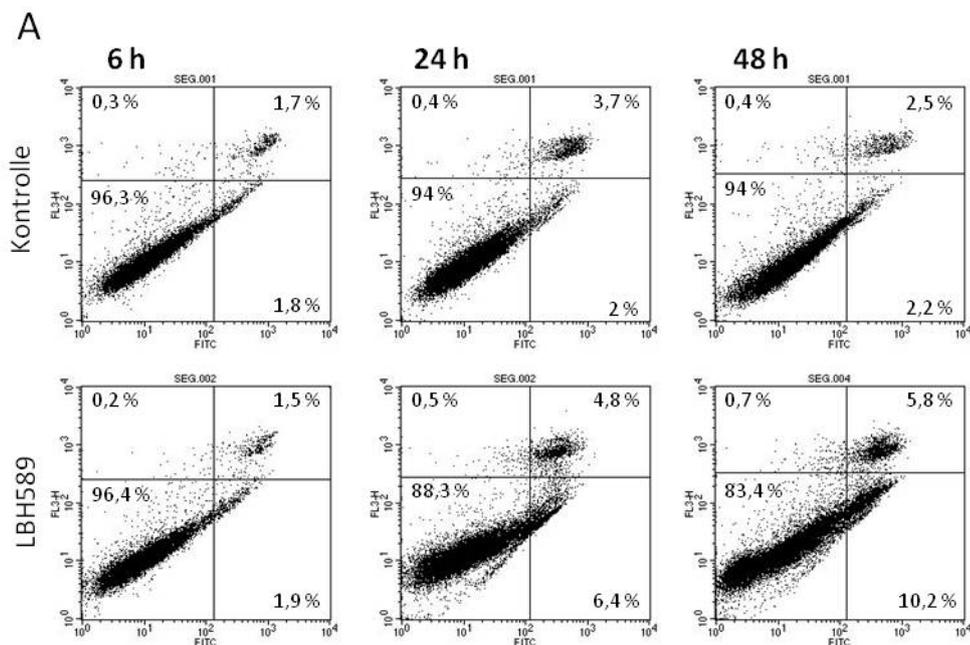


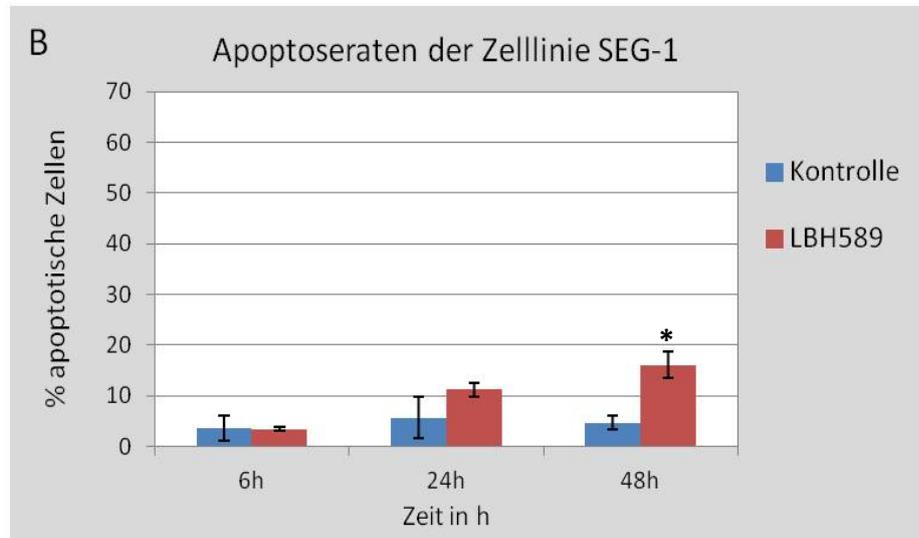
**Abb. 4.13** Darstellung der Apoptoseraten der Zelllinie TE-7 unter LBH589-Behandlung (A+B). In A Darstellung der Ergebnisse in Form von Dotplots. In B Auftragung der Mittelwerte aller Messungen im Balkendiagramm mit Standardabweichung. Die Zellen wurden für 6 h, 24 h und 48 h mit 0,05  $\mu$ M LBH589 behandelt. Zu jedem Zeitpunkt erfolgte die Detektion apoptotischer Zellen mittels Annexin-V-Färbung und Durchflusszytometrie (siehe 3.3.2). \* Signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) zur Kontrolle vorhanden.

## 4 Ergebnisse

Die Untersuchung der Apoptoseraten unter LBH589-Behandlung zeigt in der Zelllinie TE-7 eine deutliche Zunahme an apoptotischen Zellen über die Zeit. Nach 6 h Behandlungsdauer ist der Anteil an apoptotischen Zellen in der behandelten und der Kontrollgruppe mit 6 %, bzw. 6,8 % annähernd gleich und damit nicht signifikant ( $p > 0,05$ ). Im weiteren Verlauf ändert sich dies. Nach 24 h gibt es einen signifikanten Unterschied ( $p < 0,05$ ), unter den behandelten Zellen sind 32,8 % in Apoptose, in der Kontrollgruppe liegt dieser Anteil bei 11,2 %. Weitere 24 h später sind unter den LBH589 behandelten Zellen 62,9 %, die sich in Apoptose befinden. Im Vergleich zur Kontrollgruppe löst LBH589 Apoptose mit deutlicher Signifikanz in der Zelllinie TE-7 aus ( $p < 0,001$ ).

Für die Zelllinie SEG-1 sehen die Ergebnisse folgendermaßen aus.





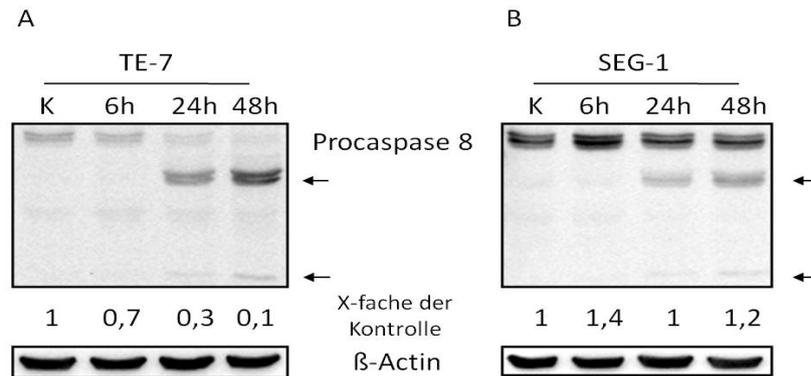
**Abb. 4.14 Darstellung der Apoptoseraten der Zelllinie SEG-1 unter LBH589-Behandlung (A +B).** In A Darstellung der Ergebnisse in Form der Dotplots. In B Auftragung der Mittelwerte aller Messungen im Balkendiagramm mit Standardabweichung. Die Zellen wurden für 6 h, 24 h und 48 h mit 0,05  $\mu$ M LBH589 behandelt. Zu jedem Zeitpunkt erfolgte die Detektion apoptotischer Zellen mittels Annexin-V-Färbung und Durchflusszytometrie (siehe 3.3.2). \* Signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) zur Kontrolle vorhanden.

Nach sechsständiger LBH589-Behandlung findet sich ein Anteil an apoptotischen Zellen von 3,4 %, in der unbehandelten Kontrollgruppe 3,5 %. In der Kontrolle bleibt dieser Anteil nach 24 h bei 5,7 %. Unter LBH589-Einfluss steigt die Apoptoserate auf 11,2 %. Nach 48 h kommt es erstmalig zu einem signifikanten Unterschied in der Apoptoserate ( $p < 0,05$ ) zwischen der Behandlung mit LBH589 (16 %) und der Kontrollgruppe (4,7 %); bei fehlender Aktivierung der Caspase 3 in dieser Zelllinie muss die Apoptoseinduktion hier einen Caspase 3 unabhängigen Weg nehmen.

#### 4.4.2 Analyse der Expression weiterer apoptosespezifischer Proteine

Im Kapitel 4.2 wurden die Ergebnisse der orientierenden Untersuchung der Proteinexpression der Zelllinien TE-7 und SEG-1 unter Einfluss der LBH589-Behandlung dargestellt. Dabei wurden bereits apoptoseassoziierte Proteine wie Caspase 3, p53 und p21 untersucht. Im folgenden Abschnitt sind die Ergebnisse weiterer apoptoseassoziiierter Proteine dargestellt, die auf ihr Expressionsmuster unter LBH589-Behandlung untersucht worden sind.

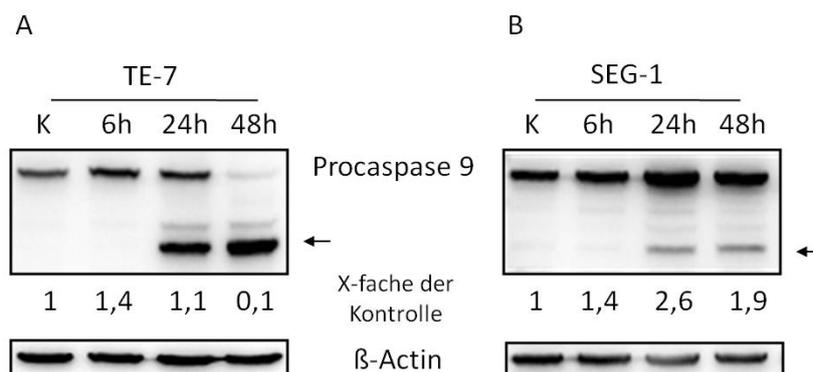
Die Caspase 8 ist eine Initiatorcaspase des extrinsischen Weges der Apoptose. Durch die Aktivierung des Todesrezeptors (Fas-Protein) durch, z. B. den Fas-Liganden, wird eine Reaktionskette in Gang gesetzt, an deren Ende die Aktivierung der Procaspase 8 durch Bindung an Adapterproteine steht.



**Abb. 4.15 Einfluss des HDACI LBH589 auf die Aktivierung der Caspase 8 in den Zelllinien TE-7 (A) und SEG-1 (B).** Die Zellen wurden über 6 h, 24 h und 48 h mit 0,05  $\mu$ M LBH589 behandelt. K entspricht der unbehandelten Kontrolle. Das ubiquitär exprimierte  $\beta$ -Actin dient als Mengenkontrolle des Gesamtproteins. Die Procaspase 8 hat ein Molekulargewicht von 57 kDa, das der Spaltprodukte (siehe Pfeile) liegt bei 43 und 18 kDa, wobei letzteres das spaltungsaktive Fragment darstellt.

Unter dem Einfluss des HDACI LBH589 kommt es in beiden Zelllinien zu einer Spaltung der Procaspase 8. In TE-7 kommt es zu einer Abnahme der Proteinkonzentration der Procaspase 8 nach 6 h auf 70 %, über 30 % nach 24 h, auf 10 % der Kontrolle nach 48 h. Reziprok dazu verhält sich der Proteingehalt des 43 kDa großen Spaltprodukts der Procaspase 8, welches nach 24 h um das 11-fache und nach 48 h um das 20-fache stärker ausgeprägt ist im Vergleich zum 6-h-Wert. Das spaltungsaktive Fragment (18 kDa) weist nach 48 h das 1,2-fache des Proteingehalts des 6-h-Wertes auf. Die Zelllinie SEG-1 legt bei der Procaspase 8 nach 6 h LBH-Behandlung zunächst auf das 1,4-fache der Kontrolle zu. Nach 24 h wird der gleiche Proteingehalt wie der der Kontrolle erreicht, danach steigt die Procaspase 8 auf das 1,2-fache der Kontrolle. Bei der 43-kDa-Bande verhält es sich ähnlich, wie bei der Zelllinie TE-7. Ein Kontrollwert ist nicht messbar. Der 24-h-Wert ist um das 9,8-fache und der 48-h-Wert um das 14-fache größer als der 6-h-Wert. Das spaltungsaktive Fragment (18 kDa) weist nach 48 h das 1,2-fache des Proteingehalts des 6-h-Wertes auf.

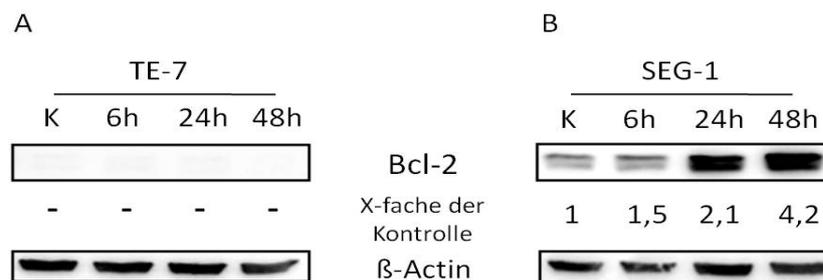
Die Procaspase 9, die Initiatorcaspase des intrinsischen Wegs der Apoptose, verbindet sich unter proapoptotischen Stimuli mit Apaf 1 und aus den Mitochondrien freigesetztem Cytochrom c zum sogenannten Apoptosom. Dieser Komplex spaltet einerseits die Procaspase 9 in ihre aktive Form, woraufhin andererseits eine Kaskade durch die Aktivierung von Effektorcaspasen, wie z. B. die Caspase 3, ausgelöst werden kann.



**Abb. 4.16 Einfluss des HDACI LBH589 auf die Aktivierung der Caspase 9 in den Zelllinien TE-7 (A) und SEG-1 (B).** Die Zellen wurden über 6 h, 24 h und 48 h mit 0,05  $\mu$ M LBH589 behandelt. K entspricht der unbehandelten Kontrolle. Das ubiquitär exprimierte  $\beta$ -Actin dient als Mengenkontrolle des Gesamtproteins. Die Procaspase 9 hat ein Molekulargewicht von 47 kDa, das des spaltungsaktiven Fragments (siehe Pfeil) liegt bei 35 kDa.

In beiden Zelllinien kann unter der Behandlung mit LBH589 das 35 kDa große spaltungsaktive Fragment der Caspase 9 nachgewiesen werden, auch wenn es Unterschiede in der Menge des Spaltproduktes gibt. Eine Ratio kann für die Spaltprodukte nicht angegeben werden, weil in der Kontrolle und bei dem 6-h-Wert keine Banden densitometrisch detektiert werden konnten. Es lässt sich eine komplette Aktivierung der Procaspase 9 in TE-7 nach 48 h feststellen, da fast ausschließlich nur noch das spaltungsaktive Fragment (35 kDa) nachzuweisen ist. In der Zelllinie SEG-1 steigt der Proteingehalt der Procaspase 9 zuerst auf das 1,4-fache der Kontrolle, nach 24 h auf das 2,6-fache und sinkt dann nach 48 h wieder auf das 1,9-fache des Gehalts der Kontrolle. Bei einer signifikanten Apoptoseinduktion ohne Aktivierung der Caspase 3 in der Zelllinie SEG-1 ist evtl. die hierarchische Gliederung der Caspasen aufgehoben und Caspase 8 oder 9 übernehmen hier die Funktion einer Effektorcaspase.

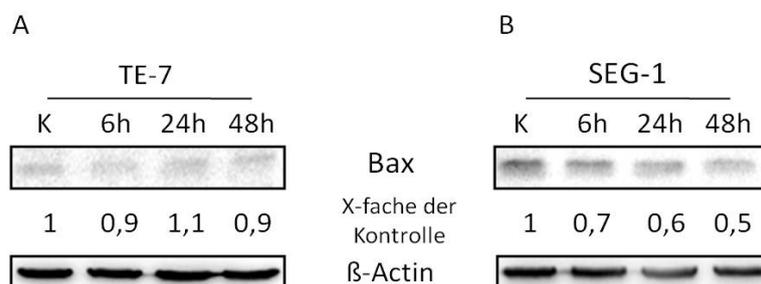
Neben den Caspasen spielt eine weitere Proteinfamilie eine wichtige Rolle in der Regulierung der Apoptose. Bei der Bcl-2-Proteinfamilie handelt es sich um kleine regulatorische Proteine, wobei einige pro- und andere antiapoptotisch wirksam sind. Untersucht wurden das antiapoptotische Bcl-2 und das proapoptotische Bax. Dabei ist eine hohe Bax/Bcl-2 Ratio mit einer erhöhten Sensibilität für eine Apoptoseinduktion assoziiert.



**Abb. 4.17 Einfluss des HDACi LBH589 auf den Bcl-2-Proteingehalt in den Zelllinien TE-7 (A) und SEG-1 (B).** Die Zellen wurden über 6 h, 24 h und 48 h mit 0,05  $\mu$ M LBH589 behandelt. K entspricht der unbehandelten Kontrolle. Das ubiquitär exprimierte  $\beta$ -Actin dient als Mengenkontrolle des Gesamtproteins.

In TE-7 lässt sich weder in der Kontrolle noch unter LBH589-Behandlung Bcl-2 nachweisen. Dagegen findet in der Zelllinie SEG-1 ein Anstieg des antiapoptotischen Proteins statt. Dieser beginnt mit einer Zunahme des Proteingehalts um das 1,5-fache der Kontrolle nach 6 h und setzt sich mit dem 2,1-fachen nach 24 h weiter fort. Nach weiteren 24 h wird das 4,2-fache an Bcl-2-Protein der Kontrolle erreicht.

Folgend die Ergebnisse für das proapoptotische Protein Bax.



**Abb. 4.18 Einfluss des HDACi LBH589 auf den Bax-Proteingehalt in den Zelllinien TE-7 (A) und SEG-1 (B).** Die Zellen wurden über 6 h, 24 h und 48 h mit 0,05  $\mu$ M LBH589 behandelt. K entspricht der unbehandelten Kontrolle. Das ubiquitär exprimierte  $\beta$ -Actin dient als Mengenkontrolle des Gesamtproteins.

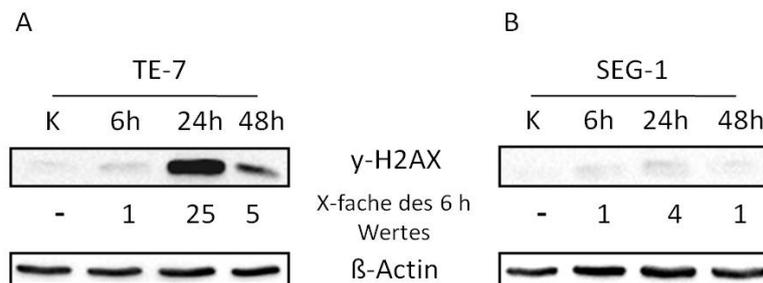
Der Bax-Proteingehalt von TE-7 nimmt nach 6 h zunächst auf 90 % der Kontrolle ab, steigt nach 24 h auf 110 % der Kontrolle an und sinkt anschließend nach 48 h wieder auf 90 % der Kontrolle ab. Aufgrund des Fehlens von Bcl-2 in dieser Zelllinie spielt die Bax/Bcl-2 Ratio in der Zelllinie TE-7 keine Rolle. In der Zelllinie SEG-1 dagegen ist eine kontinuierliche Konzentrationsabnahme von Bax zu verzeichnen. Nach 6 h Behandlungsdauer mit LBH589 lässt sich eine Bax-Konzentration von 70 % der Kontrolle messen. Diese nimmt weiter ab und liegt nach 24 h bei 60 % und nach 48 h bei 50 % der Kontrolle.

Tab. 9 Bax/Bcl-2 Ratio

	<b>Kontrolle</b>	<b>6 h LBH589</b>	<b>24 h LBH589</b>	<b>48 h LBH589</b>
<b>Bax/Bcl-2 Ratio</b>	1,58	0,76	0,45	0,18

Die Bax/Bcl-2 Ratio verschiebt sich bei der Zelllinie SEG-1 unter der LBH589-Behandlung zu Gunsten eines antiapoptotischen Verhältnisses.

Der Verlust der chromosomalen Integrität durch DNA-Doppelstrangbrüche führt zu einer spezifischen Phosphorylierung des Histons H2AX am Serin 139. Diese modifizierte Form wird auch als  $\gamma$ -H2AX bezeichnet. Kann dieser Marker nachgewiesen werden, ist das ein früher Hinweis auf die Entwicklung einer Apoptose. Da in der densitometrischen Auswertung bei beiden Zelllinien kein Wert für die Kontrolle gemessen werden konnte, wurde der 6 h Wert als Referenzwert verwendet.



**Abb. 4.19 Einfluss des HDACI LBH589 auf die Menge an  $\gamma$ -H2AX in den Zelllinien TE-7 (A) und SEG-1 (B).** Die Zellen wurden über 6 h, 24 h und 48 h mit 0,05  $\mu$ M LBH589 behandelt. K entspricht der unbehandelten Kontrolle. Das ubiquitär exprimierte  $\beta$ -Actin dient als Mengenkontrolle des Gesamtproteins.

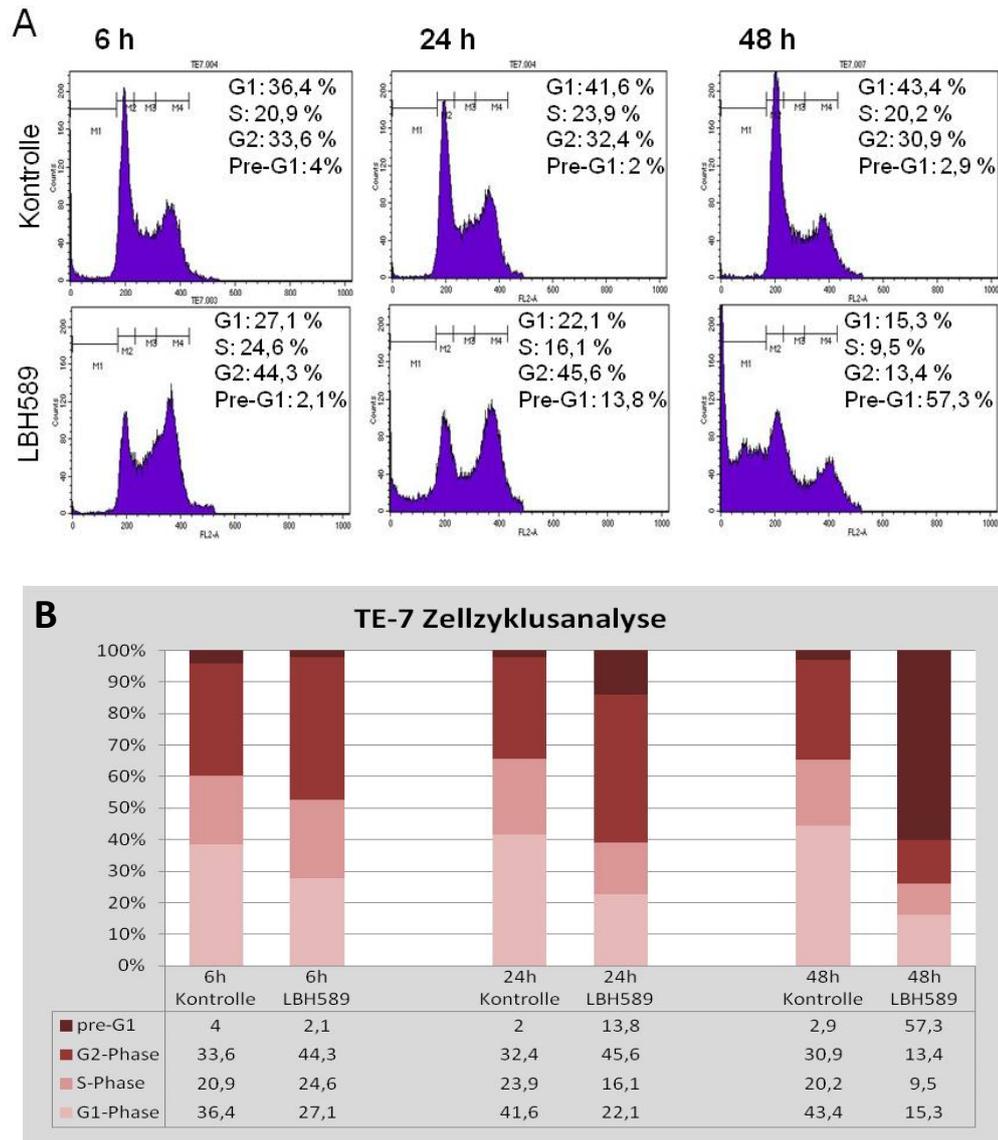
In der Zelllinie TE-7 kommt es unter LBH589-Behandlung zu einer Bildung von  $\gamma$ -H2AX. Zunächst ist nach 6 h eine sehr schwache Bande darstellbar. Nach 24 h kommt es zu einer 25-fachen Zunahme an  $\gamma$ -H2AX im Vergleich zum 6-h-Wert. Im weiteren Verlauf nimmt die Bandenstärke wieder ab, ist nach 48 h aber immer noch 5-fach höher als beim 6 h Wert. In der Zelllinie SEG-1 kommt es über die Zeit kaum zu einer Veränderung in der absoluten Menge von Doppelstrangbrüchen. Nach 24 h kommt es im Vergleich zum 6 h Wert zu einer 4-fachen Zunahme an  $\gamma$ -H2AX, während nach 48 h wieder der Zustand des 6 h Wertes erreicht wird.

#### 4.5 Zellzyklusanalyse der Zelllinien TE-7 und SEG-1 unter Einfluss von LBH589

Die Regulation des Zellzyklus kann in Krebszellen nicht mehr vom Organismus kontrolliert werden. Daher ist es von besonderem Interesse, den Einfluss des Histondeacetylase-Inhibitors LBH589 auf den Zellzyklus der beiden Karzinomzelllinien TE-7 und SEG-1 zu untersuchen. Es wurden jeweils mind. zwei unabhängige Versuchsansätze durchgeführt.

#### 4.5.1 Zellzyklusanalyse mit Hilfe der Durchflusszytometrie

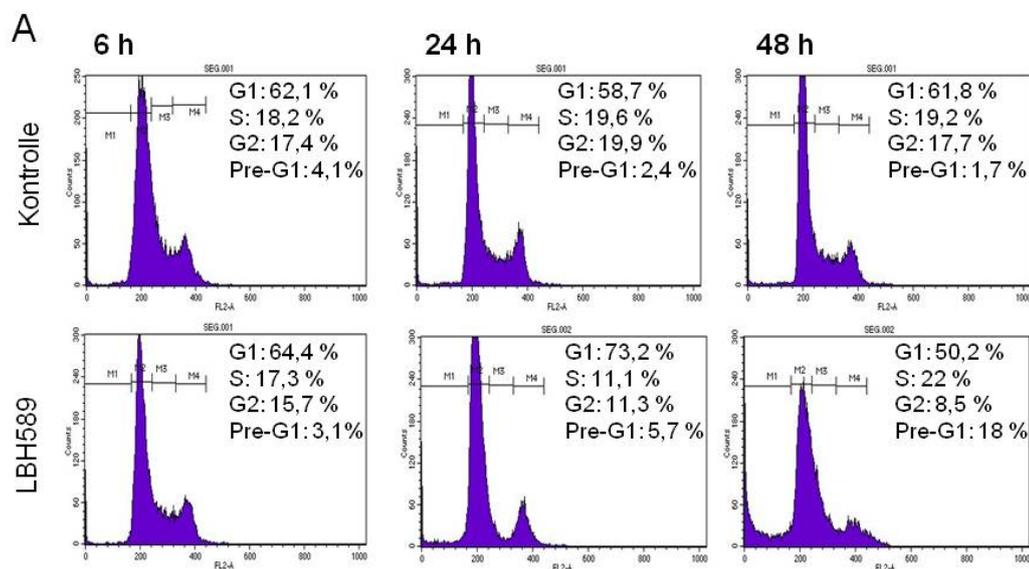
Es folgen die Ergebnisse der Zellzyklusanalyse der Zelllinie TE-7, die mit Hilfe der Durchflusszytometrie erhoben wurden. Die Ergebnisse sind zum einen in Form von Histogrammen, zum anderen in Diagrammform dargestellt.

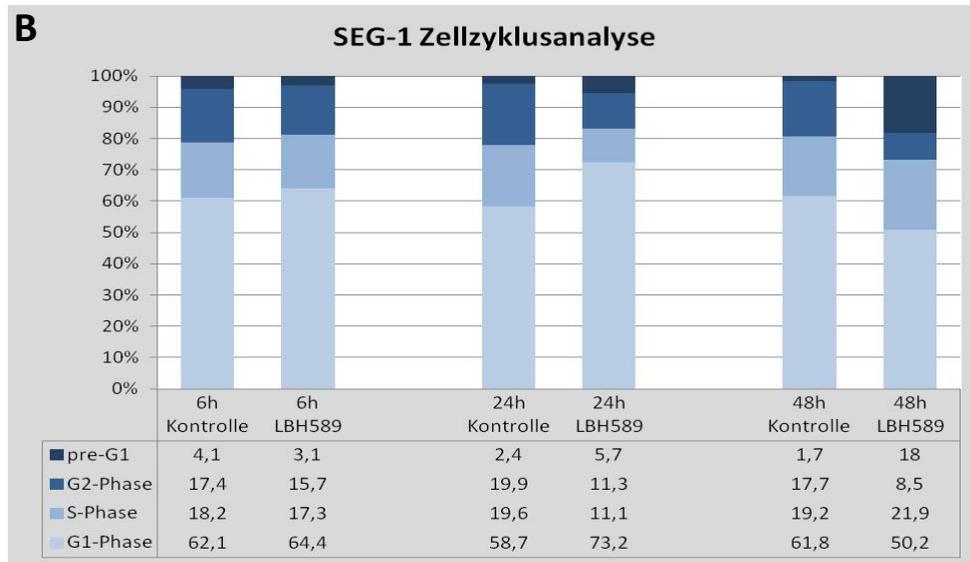


**Abb. 4.20 Zellzyklusanalyse der Zelllinie TE-7 unter LBH589-Behandlung (A, B).** Die Zellen wurden über 6 h, 24 h und 48 h mit 0,05  $\mu$ M LBH589 behandelt. Anschließend wurde wie unter 3.3.1 beschrieben die Zellzyklusanalyse durchgeführt. In A Darstellung der Ergebnisse in Form von Histogrammen. In B sind die Mittelwerte der Ergebnisse der Durchflusszytometrie dargestellt. Die angegebenen Werte entsprechen den Mittelwerten.

Man erkennt eine Normalverteilung der Zellen bzgl. der Zellzyklusphasen in den Versuchsansätzen der Kontrollgruppe, mit der größten Fraktion der Zellen in der G1-Phase. Die Behandlung der Zelllinie TE-7 mit dem HDACI LBH589 führt zu einer Verschiebung der Zellen innerhalb des Zellzyklus zu Gunsten der G2-Phase. Im Vergleich zu der Kontrollgruppe befinden sich nach sechsständiger Behandlungsdauer 13,3 %, nach 24 h 10,7 % mehr Zellen in der G2-Phase. Dieser Trend setzt sich nach 24 h weiter fort. Vergleicht man die Zeitwerte 6 h und 24 h der behandelten Gruppe untereinander, stellt man fest, dass der Anteil der Zellen in der G2-Phase annähernd stabil bleibt. Im Gegensatz dazu kommt es zu einer Abnahme in der S-Phase (8,6 %) und in der G1-Phase (5 %), wobei sich diese Anteile in die Pre-G1-Region verschieben. Nach 48 h überwiegt eindeutig mit 57,3 % der Anteil, der sich in der Apoptose befindet. Im Vergleich der Zeitwerte 24 h und 48 h der behandelten Gruppen untereinander nimmt die G2-Phase relativ mit 70 % am stärksten ab. Um 41 % verkleinert sich der Anteil der S-Phase, um 31 % der der G1-Phase. Es kommt also nach einem G2-Arrest, der p21<sup>waf1</sup>-unabhängig über die Aktivierung der Chk1 (p-Chk1) erfolgt, zu einem Fortschreiten in die Apoptose.

Folgend die Ergebnisse der Zellzyklusanalyse der Zelllinie SEG-1.



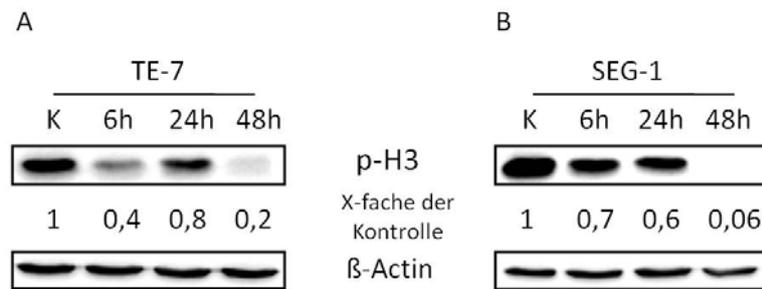


**Abb. 4.21 Zellzyklusanalyse der Zelllinie SEG-1 unter LBH589-Behandlung (A, B).** Die Zellen wurden über 6 h, 24 h und 48 h mit 0,05  $\mu$ M LBH589 behandelt. Anschließend wurde wie unter 3.3.1 beschrieben die Zellzyklusanalyse durchgeführt. In A Darstellung der Ergebnisse in Form von Histogrammen. In B sind die Ergebnisse der Durchflusszytometrie dargestellt. Die angegebenen Werte entsprechen den Mittelwerten.

Die Zelllinie SEG-1 lässt ebenfalls in den Versuchsansätzen der Kontrollgruppe eine normale Verteilung der Zellen in den verschiedenen Zellzyklusphasen erkennen. Unter der Behandlung mit LBH589 zeigt sich nach der Behandlungsdauer von 24 h eine Akkumulation der Zellen in der G1-Phase. Dieser G1-Arrest findet  $p21^{waf1}$ -abhängig statt (vergleiche 4.2). Bei 24 h befinden sich 73 % der behandelten Zellen in der G1-Phase, im Gegensatz zu 59 % in der Kontrollgruppe. Eine Verschiebung in die Pre-G1 Region, und somit in die Apoptose, findet zu diesem Zeitpunkt in keinem nennenswerten Maße statt. Diese Verschiebung setzt erst nach 48-stündiger Behandlungsdauer ein, wo sich nun 18 % der Zellen in Apoptose befinden. Außerdem kommt es zu einer Leerung der G1-Phase, bei gleichzeitig sinkender  $p21^{waf1}$ -Konzentration. Es befinden sich nach 48 h LBH589-Behandlung 29 % weniger Zellen in der G1-Phase, im Vergleich zur Kontrolle. Ein Anteil von 11 % der Zellen aus der G1-Phase gehen in die S-Phase über.

#### 4.5.2 Zellzyklusanalyse mit Hilfe des mitosespezifischen Antikörpers gegen phospho-H3

Der Nachweis von Phosphatgruppen am Histon 3 (p-H3) ist ein sicherer Hinweis für die Chromosomenkondensation, die während der Mitose und Meiose auftritt. Beide Zelllinien wurden auf diesen mitosespezifischen Marker hin untersucht.



**Abb. 4.22 Einfluss des HDACI LBH589 auf den Gehalt an p-H3 in den Zelllinien TE-7 (A) und SEG-1 (B).** Die Zellen wurden über 6 h, 24 h und 48 h mit 0,05  $\mu$ M LBH589 behandelt. K entspricht der unbehandelten Kontrolle. Das ubiquitär exprimierte  $\beta$ -Actin dient als Mengenkontrolle des Gesamtproteins.

Unter dem Einfluss von LBH589 findet sich in der Zelllinie TE-7 ein unbeständiger Verlauf im Gehalt von p-H3. Die Menge an p-H3 sinkt nach sechsständiger Behandlung auf 40 % des Kontrollgehalts an p-H3 ab. Ein Zeitpunkt an dem die Chk1 maximal aktiviert ist (p-Chk1), wodurch ein G2-Arrest - p21<sup>waf1</sup>-unabhängig - durch die Zellzyklusanalyse nachgewiesen werden konnte. Nach 24 h steigt der Gehalt auf 80 % der Kontrolle an, um dann wieder abzufallen und nach 48 h nur noch 20 % des Kontrollwertes zu betragen. In der Zelllinie SEG-1 dagegen kommt es zu einer kontinuierlichen Abnahme an p-H3. Diese beginnt nach 6 h mit 70 % des Kontrollgehalts, setzt sich nach 24 h mit 60 % der Kontrolle weiter fort und endet mit einer Menge an p-H3 von 6 % der Kontrolle nach 48 h.

#### 4.6 Einfluss von LBH589 auf die transkriptionelle Regulation in den Zelllinien TE-7 und SEG-1

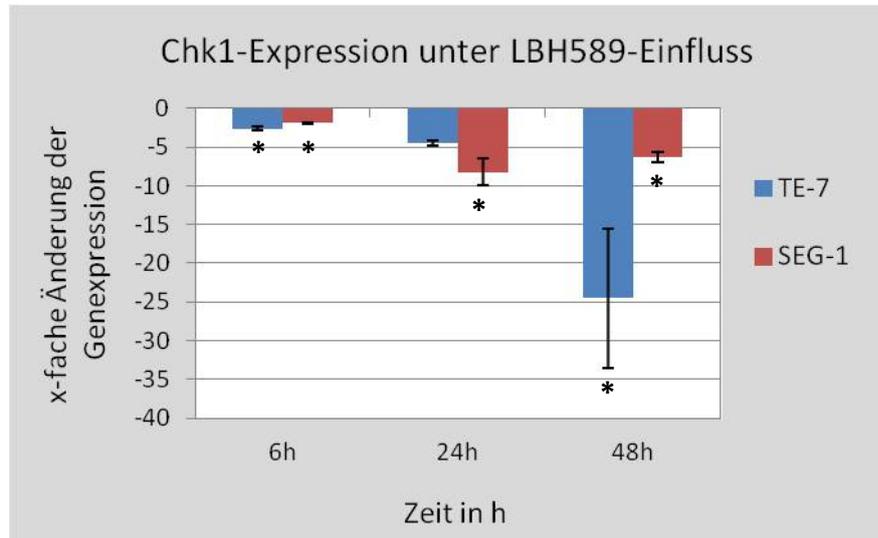
Um eine Aussage darüber treffen zu können, ob die Beeinflussung der Expression der Proteine Chk1 und p21 auf transkriptioneller Ebene stattfindet, wurde für beide Proteine eine quantitative *Real-Time*-PCR (siehe 3.5.4) durchgeführt. Die unter 4.6.1 und 4.6.2 dargestellten relativen Veränderungen der Genexpression (*Ratios*) wurden nach folgender Formel berechnet:

$$2^{(Rt-Et)} / 2^{(Rn-En)}$$

Dabei gibt Rt die *threshold cycle* Nummer des Kontrollgens ( $\beta$ 2-MG) und Et die des untersuchten Gens (Chk1, bzw. p21) in LBH589-behandelten Zellen an. Rn und En entsprechen den Werten in den unbehandelten Kontrollen.

#### 4.6.1 Untersuchung der Checkpointkinase-1-Expression auf mRNA-Ebene

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Analyse der Chk1-Expression auf mRNA-Ebene der Zelllinien TE-7 und SEG-1 dargestellt.

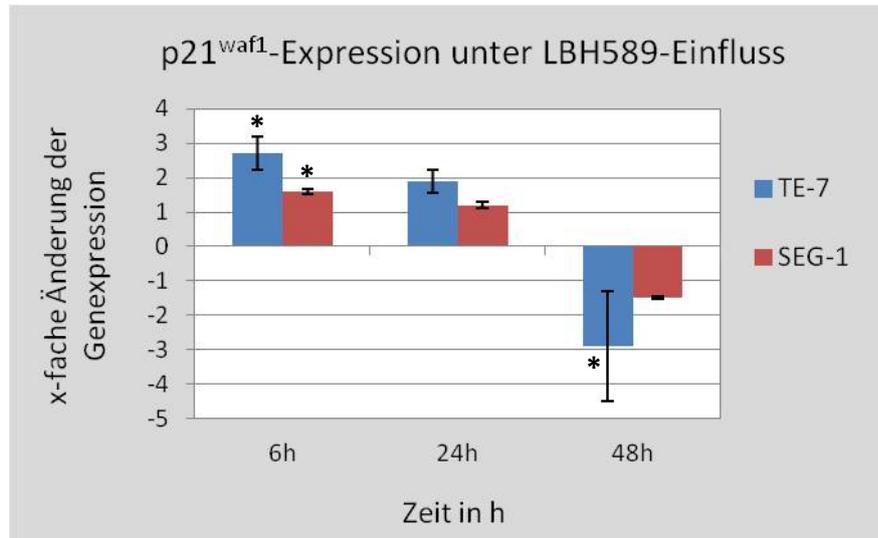


**Abb. 4.23** Untersuchung der Chk1-Expression auf mRNA-Ebene der Zelllinien TE-7 und SEG-1 unter Einfluss von LBH589. Die Zellen wurden über 6 h, 24 h und 48 h mit 0,05  $\mu$ M LBH589 behandelt. Anschließend wurde wie unter 3.5.3 und 3.5.4 beschrieben eine Quantitative *Real-Time*-PCR durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung der relativen Genexpression von mindestens zwei unabhängigen Versuchsansätzen. \* Signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) zur Kontrolle vorhanden.

In beiden Zelllinien kommt es zu einer Herunterregulation der Expression der Chk1-mRNA unter der Behandlung mit LBH589. Nach sechsstündiger Behandlungsdauer kommt es in TE-7 zu einer Repression auf das -2,6-fache und in SEG-1 auf das -1,9-fache der Kontrolle. Zum nächsten Zeitpunkt senkt die Zelllinie TE-7 die Expression von Chk1-mRNA auf das 4,5-fache und SEG-1 auf das 8,2-fache des Kontrollwertes. Hierbei ist in den TE-7-Zellen die Abnahme im Vergleich zur Kontrollgruppe nicht signifikant ( $p > 0,05$ ). Nach 48 h werden schließlich das -24,5-fache in TE-7 und das -6,3-fache der Kontrolle in SEG-1 erreicht.

#### 4.6.2 Untersuchung der p21<sup>waf1</sup>-Expression auf mRNA-Ebene

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Untersuchung der p21<sup>waf1</sup>-Expression auf mRNA-Ebene der Zelllinien TE-7 und SEG-1 dargestellt.



**Abb. 4.24** Untersuchung der p21<sup>waf1</sup>-Expression auf mRNA-Ebene der Zelllinien TE-7 und SEG-1 unter Einfluss von LBH589. Die Zellen wurden über 6 h, 24 h und 48 h mit 0,05  $\mu$ M LBH589 behandelt. Anschließend wurde wie unter 3.5.3 und 3.5.4 beschrieben eine Quantitative *Real-Time*-PCR durchgeführt. Dargestellt sind die Mittelwerte und die Standardabweichung der relativen Genexpression von mindestens zwei unabhängigen Versuchsansätzen. \* Signifikanter Unterschied ( $p < 0,05$ ) zur Kontrolle vorhanden.

LBH589 nimmt ebenfalls Einfluss auf die Expression der p21<sup>waf1</sup>-mRNA. Nach 6 h Wirkdauer steigt in der Zelllinie TE-7 die Genexpression auf das 2,7-fache und in SEG-1 nur auf das 1,6-fache der Kontrolle an. Danach sinken die Werte ab auf das 2-fache in TE-7 und auf das 1,2-fache des Kontrollwertes in SEG-1, wobei in beiden Zelllinien diese Tendenz im Vergleich zur Kontrolle nicht signifikant ist ( $p > 0,05$ ). Nach 48 h kommt es in beiden Zelllinien zu einer Abnahme in der Genexpression. In TE-7 verringert sich die Menge an mRNA annähernd auf das 3-fache und in SEG-1 auf das 1,4-fache der Kontrolle. In den SEG-Zellen ist diese Abnahme nicht signifikant ( $p > 0,05$ ).

## 5 Diskussion

### 5.1 Apoptoseinduktion mittels LBH589 in den Zelllinien TE-7 und SEG-1

In dieser Studie soll u. a. das Ausmaß der Apoptoseinduktion durch den HDACI LBH589 in Zellen der Zelllinie TE-7 (Plattenepithelkarzinom des Ösophagus) und der Zelllinie SEG-1 (NSCLC) untersucht werden. Im Vergleich zur Zelllinie TE-7, die ein Funktionsverlust des p53-Gens kennzeichnet, kommt es in der p53-Wildtyp Zelllinie SEG-1 unter dem Einfluss von LBH589 zu einer sehr viel geringer ausgeprägten und später einsetzenden Apoptoseantwort (siehe 4.4). Anhand der in dieser Studie untersuchten Proteine, lässt sich für jede Zelllinie jeweils eine Hypothese für eine spezifische Signalkaskade als Reaktion auf die LBH589-Behandlung aufstellen. Dabei stellte sich heraus, dass der jeweilige p53- und Chk1-Status entscheidenden Einfluss auf die Stärke der Signalantwort nimmt.

Caspasen sind eine Gruppe von wichtigen Proteasen, die im Rahmen der Apoptoseinduktion eine zentrale Rolle einnehmen. In der Zelllinie TE-7 kann eine Aktivierung der Caspasen unter LBH589-Behandlung nachgewiesen werden. Sowohl Caspase 9 als Initiatorcaspase des intrinsischen Weges der Apoptose, als auch Caspase 8 als Initiatorcaspase des extrinsischen Weges werden nach 24 h LBH589-Wirkung aktiviert. Entsprechend ist die Spaltung und somit Aktivierung der Effektorcaspase 3 nach 24 h Behandlungsdauer deutlich zu dokumentieren. Die Hochregulation der Expression von Todesrezeptoren und ihrer Liganden durch HDACI und damit eine Bahnung des extrinsischen Weges der Apoptose beschrieb bereits Nakata *et al* 2004. Dennoch wird die Aktivierung des intrinsischen Weges als der Hauptmechanismus der Apoptoseinduktion durch HDACI angesehen<sup>69, 149</sup>. Durch das Auftreten von  $\gamma$ -H2AX nach 24 h Behandlungsdauer werden DNA-Schäden nachgewiesen, die ihrerseits einen weiteren apoptotischen Stimulus darstellen. Unter dem Einfluss von LBH589 kommt es in der Zelllinie TE-7 nicht nur zu einer Aktivierung der Caspasen, sondern auch zu einem irreversiblen Anstoß der apoptotischen Signaltransduktion. In der Zelllinie SEG-1 kommt es ebenfalls zu einem Nachweis der spaltungsaktiven Fragmente der Caspase 8 und 9 nach 24 h und 48 h, jedoch in sehr viel geringerer Ausprägung im Vergleich zur Zelllinie TE-7. Schaut man sich die Endstrecke dieser Kaskade in Form der Caspase 3 an, muss man feststellen, dass der apoptotische Stimulus durch LBH589 in der Zelllinie SEG-1 nicht dazu führt, die Caspase 3 im gleichen Umfang, wie in der

Zelllinie TE-7 zu aktivieren. Die Apoptoseinduktion in SEG-1 nach 48 h muss hier unabhängig von der Caspase 3 verlaufen. Eventuell ist in diesem Fall die strenge hierarchische Gliederung der Caspasen aufgehoben und Caspase 8 und/ oder 9 fungieren als Effektorcaspase. Der Nachweis von  $\gamma$ -H2AX gelingt nur in minimalen Mengen, so dass bei vorhandenem p53 auf ein funktionierendes DNA-Reparatursystem in der Zelllinie SEG-1 zu schließen ist.

Im Rahmen der Apoptoseinduktion ist außerdem die Bcl-2-Proteinfamilie von Interesse. Es ist bekannt, dass ein hoher Gehalt an Bcl-2 einen Resistenzmechanismus bei der Behandlung mit HDACI darstellt. Bcl-2 kann proapoptotische Proteine wie Bax neutralisieren, wirkt stabilisierend auf die Mitochondrienmembran und kann durch Bindung an das c-terminale Ende von Apaf-1 dessen Assoziation mit der Caspase 9, und somit die Aktivierung dieser Caspase verhindern<sup>92, 150, 151</sup>. Im Vergleich der beiden Zelllinien miteinander ist deutlich zu sehen, dass TE-7 mit einer hohen Apoptoserate von 62 % nach 48 h zu keinem Zeitpunkt Bcl-2 exprimiert und somit nicht über diesen Resistenzmechanismus verfügt. Im Gegensatz dazu die Zelllinie SEG-1. Die Bax/Bcl-2 Ratio wird über die Zeit der LBH589-Behandlung immer kleiner und ein damit zunehmend antiapoptotisches Verhältnis hergestellt. Dennoch wird nach 48 h erstmalig Apoptose signifikant nachgewiesen, jedoch liegt die Rate an apoptotischen Zellen mit 14,5 % deutlich unter der Rate der Zelllinie TE-7 (62 %). Die Zelllinie SEG-1 verfügt somit über den beschriebenen Bcl-2 abhängigen Resistenzmechanismus, der die HDACI-Wirkung abschwächt. In der Literatur wird außerdem berichtet, dass HDACI proapoptotische Proteine, wie Bim, Bak und Bax hochregulieren<sup>152, 153</sup>. In der vorliegenden Arbeit kann diese Aussage in Bezug auf das Bax-Protein nicht bestätigt werden, da in der Zelllinie TE-7 der Bax-Proteingehalt unter LBH589-Behandlung im Vergleich zur Kontrolle annähernd konstant bleibt. Ein besonderer Einfluss von Bax auf die hohen Apoptoseraten in dieser Zelllinie ist damit wenig wahrscheinlich. In der Zelllinie SEG-1 ist mit Beginn der LBH589-Applikation eine Abnahme des proapoptotischen Proteins zu verzeichnen. Diese Abnahme von Bax ist mit großer Wahrscheinlichkeit Bcl-2 vermittelt, und bestätigt somit den Bcl-2 abhängigen Resistenzmechanismus der Zelllinie SEG-1 gegenüber HDACI.

Bisher wurde die p53-unabhängige Induktion der p21<sup>waf1</sup>-Expression unter HDACI-Therapie als wichtige Ursache für den Erfolg der HDACI-Behandlung angesehen<sup>154, 155</sup>. In der Zelllinie TE-7

kommt es unter der LBH589-Behandlung bei einem niedrigen Ausgangswert von p21<sup>waf1</sup> in der Kontrolle zu einer maximalen Zunahme um 70 % des Kontrollwertes. Die Analyse der mRNA-Expression zeigt, dass dies zunächst tatsächlich durch eine Induktion der Expression bedingt ist. Nach 24 h Behandlungsdauer bleibt die Tendenz ebenfalls bei einer Zunahme an p21<sup>waf1</sup>-mRNA, jedoch ist diese nun nicht mehr signifikant. Neben der LBH589 bedingten Stimulation fehlt p53 in dieser Zelllinie als stärkster Induktor für die p21<sup>waf1</sup>-Expression. Aber gerade diese Zelllinie mit einer eher geringen p21<sup>waf1</sup>-Induktion - im Vergleich zu der Zelllinie SEG-1 - reagiert auf die Behandlung mit dem HDACI LBH589 mit einem erfolgreichem Anstoß der apoptotischen Signalkaskade, die zu einer hohen Apoptoserate von 62 % nach 48 h Behandlungsdauer führt. Der bekannte Therapieeffekt über die p21<sup>waf1</sup>-Induktion, wird in dieser Zelllinie v. a. über die Degradation der Chk1 erzielt. Die Ergebnisse sind vielversprechend, da Tumorzellen häufig im p53-Gen mutiert sind und der p21<sup>waf1</sup>-Promoter häufig durch epigenetische Modifikationen inaktiviert ist<sup>79, 147</sup>. In der Zelllinie SEG-1 kommt es nach 24 h LBH589-Behandlung zu einer starken Zunahme an p21<sup>waf1</sup>-Protein. Der Gehalt an p53 nimmt im Verlauf gering zu (vergleiche 4.2). Es ist festzuhalten, dass in der Zelllinie SEG-1 p21<sup>waf1</sup> als potenter CdK-Inhibitor und wichtiges Regulatorprotein in der Stressantwort auf zellschädigende Einflüsse zunächst deutlich hochreguliert werden kann. Neben der LBH589-Wirkung ist in dieser Zelllinie p53, als starker Stimulator von p21<sup>waf1</sup>, vorhanden. Entsprechend kann es zu einer effektiven antiapoptotischen und antiproliferativen Stressantwort kommen. Jedoch fällt auch in der Zelllinie SEG-1 nach 48 h LBH589-Behandlungsdauer der Gehalt an p21<sup>waf1</sup> im Vergleich zum 24 h Wert deutlich ab. Gleichzeitig mit dem p21<sup>waf1</sup>-Abfall ist Apoptose erstmalig signifikant mit einer Rate von 14,5 % nachzuweisen. Außerdem kommt es zu einem Fortschreiten der Zellen im Zellzyklus, aber ohne Eintritt in die Mitose (siehe 5.3). Der hohe p21<sup>waf1</sup>-Spiegel hat die Zelllinie SEG-1 bis zu diesem Zeitpunkt durch seine antiproliferative und dadurch in diesem Fall auch antiapoptotische Wirkweise, neben anderen Faktoren, vor dem Zelltod geschützt. Die Untersuchung der p21<sup>waf1</sup>-Expression auf mRNA-Ebene deutet zwar eine transkriptionelle Repression bei 48 h an, jedoch ist die Abnahme der p21<sup>waf1</sup>-mRNA nicht signifikant. Es ist bekannt, dass p21<sup>waf1</sup> über Phosphorylierung und Ubiquitinierung destabilisiert wird, in dem es dem proteasomalen Abbau zugeführt wird<sup>156, 157</sup>. Auch wurde von einer Ubiquitin-unabhängigen proteasomalen Degradation von p21<sup>waf1</sup> berichtet<sup>158</sup>. Bisher ist die Induktion der p21<sup>waf1</sup>-

mRNA-Expression über das Wegfallen der Promoter-Repression durch HDAC11-Wirkung bekannt<sup>155</sup>. Ob der HDACi LBH589 über einen dieser proteasomalen Abbauege die Abnahme in der p21<sup>waf1</sup>-Konzentration bei 48 h bewirkt bleibt eine Hypothese und bedarf der experimentellen Verifizierung.

## 5.2 Unterschiede in den Degradationsmechanismen der Checkpointkinase1 der Zelllinien TE-7 und SEG-1

In dieser Studie wird außerdem die besondere Rolle der Checkpointkinase 1 in der LBH589-abhängigen Apoptoseinduktion in den Zelllinien TE-7 und SEG-1 untersucht. In der Zelllinie SEG-1 kommt es unter dem Einfluss von LBH589 zu einem deutlichen Rückgang in der Chk1-Konzentration nach 48 h auf 20 % der Kontrolle. Auch ist zu keinem Zeitpunkt die phosphorylierte und damit aktivierte Chk1-Form (p-Chk1) nachweisbar. Gottifredi *et al* beschrieben 2001, dass p53 in Abhängigkeit von p21 eine Herunterregulation von Chk1 bewirkt. Dabei verläuft diese Suppression vor allem über die Regulation der Chk1-mRNA<sup>122</sup>. Es ist anzunehmen, dass in der Zelllinie SEG-1 dieser Weg der Chk1-Regulierung ebenfalls wahrscheinlich ist, da die mRNA-Expression von Chk1 unter LBH589 zu jedem Zeitpunkt signifikant abnimmt. Die Experimente mit dem Translations- und Proteasominhibitor zeigen, dass LBH589 in SEG-1 keinen Einfluss auf die Halbwertszeit von Chk1 nimmt. Die Ergebnisse dieser Studie sind somit übereinstimmend mit denen von Brazelle *et al*, die im Dezember 2010 ebenfalls die Repression der Chk1-Expression als Ursache für die LBH589-abhängige Herunterregulation von Chk1 in Lungenkarzinom-Zelllinien beschrieben<sup>112</sup>.

In der Zelllinie TE-7 kommt es unter der LBH589-Behandlung ebenfalls zu einer Abnahme von Chk1, obwohl hier p53 und p21<sup>waf1</sup> als Suppressoren fehlen, bzw. in geringer Konzentration vorhanden sind. Es ist bekannt, dass es in Tumorzellen zu einer Überexpression von Chk1 kommt. Außerdem wird eine intakte Chk1-Funktion als lebenswichtig für Tumorzellen angesehen, die bereits häufig in der Regulation der normalen Zellzyklus-Kontrollpunkte gestört sind<sup>159</sup>. Diese Situation ist bei TE-7 mit der funktionellen Abwesenheit von p53 und p21<sup>waf1</sup> eindeutig gegeben. In kolorektalen Karzinomen, die einen p53-Funktionsverlust haben, sind hohe Konzentrationen von Chk1 verbunden mit einer geringeren Apoptoserate<sup>160</sup>. Poehlmann *et al* zeigten 2010, dass eine Chk1-Aktivierung kolorektale HCT116-Zellen mit fehlendem

p21<sup>waf1</sup> vor mitotischer Katastrophe und damit vor dem Zelltod schützt<sup>147</sup>. Nach sechsstündiger LBH589-Behandlung kompensiert die Chk1-Aktivierung in TE-7 vorerst erfolgreich das Fehlen von p53 und p21<sup>waf1</sup> hinsichtlich der Induktion einer antiapoptotischen und antiproliferativen Stressantwort: Apoptose findet zu diesem Zeitpunkt nicht signifikant statt und es befinden sich 40 % weniger Zellen in der Mitose im Vergleich zur Kontrollgruppe (siehe p-H3 4.5.2). Nach 24 h kommt es jedoch zu einer Reduktion der Chk1 und p-Chk1-Proteinmenge. Die Ergebnisse der Experimente mit dem Translations- und Proteasominhibitor zeigen, dass LBH589 Einfluss auf die Halbwertszeit der Checkpointkinase 1 in der Zelllinie TE-7 nimmt (siehe 4.3). Unter Translationsinhibition verkürzt sich die Halbwertszeit um etwa 18 h, da die Abnahme der Chk1-Proteinbande bereits deutlich nach 6h, statt erst nach 24 h Behandlungsdauer beginnt (siehe 4.3.1). Ursächlich dafür ist eine verstärkte proteasomale Degradation von Chk1, dies zeigen die Versuchsergebnisse des Proteasominhibitors MG-132. Durch die Blockade des Proteasoms kann der verstärkte Abbau von Chk1 unter LBH589 deutlich rückgängig gemacht werden (siehe 4.3.2.). Es wird eine Chk1-Proteinbande von 70 % der Kontrolle erreicht, während unter der isolierten LBH589-Behandlung die Bande nur 37 % der Kontrolle erlangt. Dies zeigt, dass in der Zelllinie TE-7 LBH589 die proteasomale Degradation von Chk1 induziert und damit diese Zellen sensibler für die Apoptoseinduktion werden. Im Jahr 2005 haben Nomura *et al* die ubiquitinabhängige proteasomale Degradation von Chk1 bereits als Mechanismus bei der Wirkung von Geldanamycin auf Glioblastomzellen beschrieben<sup>161</sup>. Dennoch kann in TE-7 unter der kombinierten Proteasominhibition und LBH589-Behandlung der Chk1-Abbau nicht vollständig gehemmt werden. Als weiterer Mechanismus konnte eine signifikant stattfindende transkriptionelle Repression von Chk1 nach 6 und 48 h nachgewiesen werden. Bei niedrigem p21<sup>waf1</sup> und fehlendem p53 ist in dieser Zelllinie die bereits in der Einleitung beschriebene allgemeine HDACi-Wirkung auf die Genexpression die Hauptursache für die transkriptionelle Chk1-Herunterregulation wahrscheinlich.

Zusammenfassend bleibt festzuhalten, dass es unter LBH589 in der Zelllinie SEG-1 in Abhängigkeit von p21<sup>waf1</sup> und p53 zu einer kontrollierten transkriptionellen Chk1-Repression kommt. Dabei stehen in SEG-1 p53 und p21<sup>waf1</sup> für die Induktion einer antiapoptotischen und antiproliferativen Stressantwort zu Verfügung. Es kommt erst nach 48 h LBH589-Behandlung zu einer signifikanten Apoptoseinduktion mit einer Rate von 14,5 %. Dagegen die Situation in der

p21<sup>waf1</sup>- und p53-defizienten Zelllinie TE-7. Hier wird Chk1, als verbleibendes essentielles Regulatorprotein, LBH589 vermittelt über verschiedene Mechanismen degradiert. Damit wird der Zelllinie TE-7 das lebenswichtige „Ersatz“-Regulatorprotein für p21<sup>waf1</sup> und p53 entzogen, wodurch die Zellen die Kontrolle über den Zellzyklus und die Proliferation verlieren und es als Folge zu einem dramatischen Anstieg in der Apoptoserate kommt.

### 5.3 Einfluss von LBH589 auf die Zellzyklusregulation

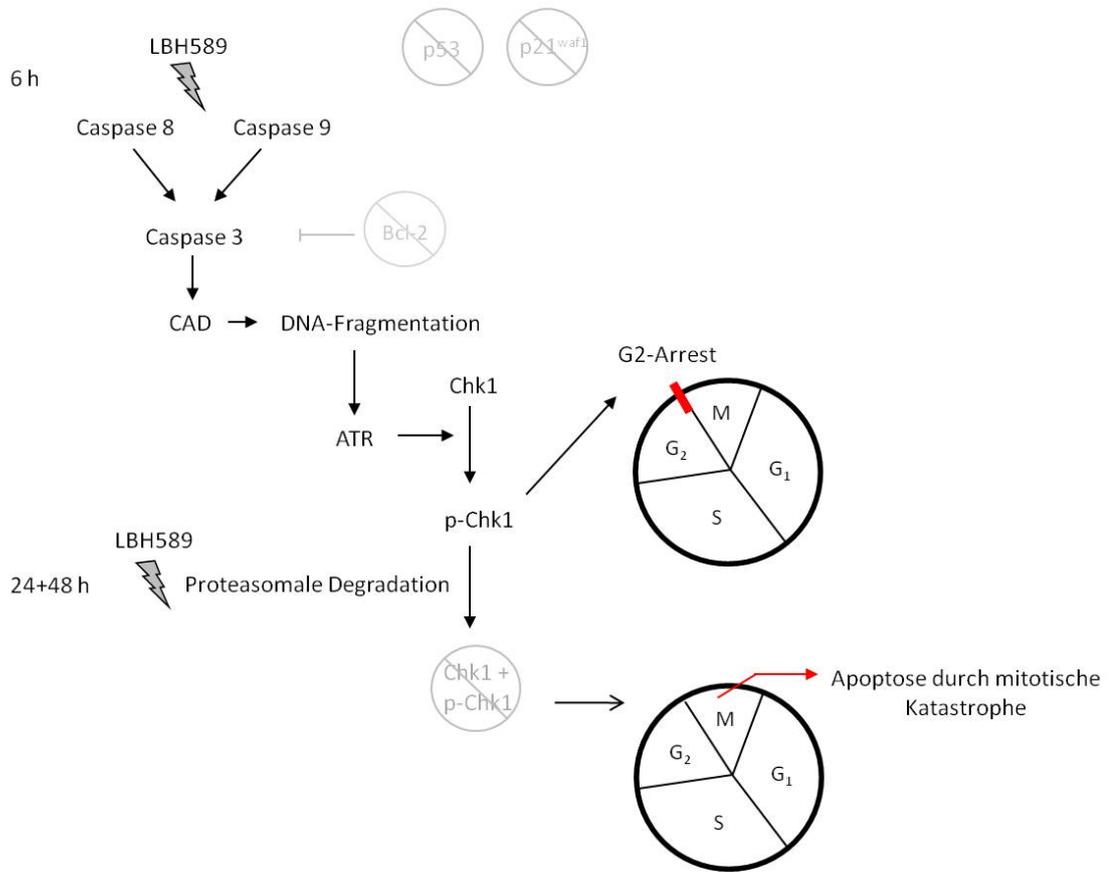
Bei Einwirkung einer schädigenden Noxe führen Checkpoint-Regulatorproteine zu einem temporären Zellzyklus-Arrest und ermöglichen somit eine erfolgreiche Beendigung der DNA-Reparatur bevor es zur Zellzyklusprogression und dem Wiedereintreten in die Mitose kommt. Dadurch findet nur bei vollständig funktionstüchtiger DNA Zellteilung statt. Kann diese Integrität der DNA nicht mehr sicher gestellt werden und die Zelle tritt trotz akkumulierter Schäden in die Mitose ein, kann dies zum Zelltod aus der Mitose heraus, zur sogenannten mitotischen Katastrophe führen<sup>162</sup>. Es hat sich gezeigt, dass der Chk1-abhängige G2-Arrest unterschiedlich in Abhängigkeit vom p53- und p21<sup>waf1</sup>-Status verlaufen kann. In Anwesenheit von p53 und p21<sup>waf1</sup> führt Chk1 zu einem klassischen G2-Arrest, der im Verlauf nach Zellzyklusprogression zu einem Überspringen der Mitose, einem Anhalten der Zellen in G1 und somit zur Zellalterung führt. Die Abwesenheit von p53/ p21<sup>waf1</sup> führt zu einem sogenannten späten G2-Arrest und nach Fortsetzung des Zellzyklus zu einem Eintreten in die Mitose resultierend in mitotischer Katastrophe bei geschädigten Zellen<sup>147</sup>.

In dieser Studie wurde ebenfalls der Einfluss von LBH589 auf die Zellzyklusregulation der Zelllinien TE-7 und SEG-1 untersucht. Nach sechsständiger LBH589-Behandlung kommt es in TE-7 zu einer Akkumulation der Zellen in der G2-Phase. Die Aktivierung von Chk1 führt zu einem späten G2-Arrest. Der mitosespezifische Antikörper p-H3 zeigt dies mit einem sinkenden Anteil in Mitose befindlicher Zellen an (40 % der Kontrolle, siehe p-H3 4.5.2). Bedingt durch transkriptionelle Repression und proteasomale Degradation kommt es im weiteren Verlauf aber zu einer Abnahme von Chk1 und seiner aktiven Form p-Chk1. Der Zelllinie TE-7 fehlt außerdem p53 für eine dauerhafte Aufrechterhaltung des G2-Checkpoints<sup>137</sup>. Beide Faktoren führen nun dazu, dass der G2-M-Checkpoint nicht mehr aufrecht erhalten werden kann. Es kommt zur Zellzyklusprogression in die Mitose, was deutlich durch einen Anstieg an p-H3 nach 24 h LBH589-

Behandlung wird. Bei gleichzeitigem Nachweis von  $\gamma$ -H2AX ist ein Großteil der DNA bereits geschädigt. Die Zellen beginnen aus der Mitose heraus Apoptose zu begehen, resultierend in mitotischer Katastrophe. Diese Aussage muss sicherlich mit der Analyse weiterer für den G2-Checkpoint wichtiger Zellzyklusregulatoren, wie Cyclin B und CDK 2, oder mit dem Nachweis der mitotischen Katastrophe mittels Immunfluoreszenz verifiziert werden.

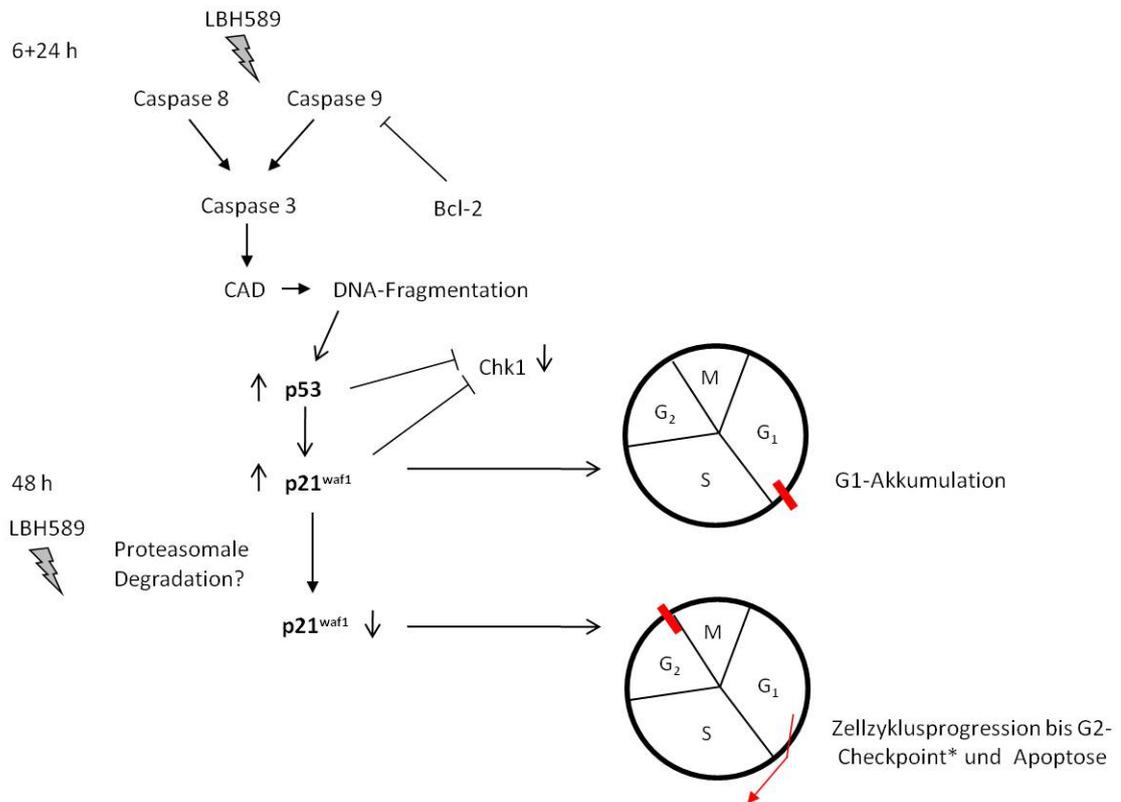
Die Zellzyklusanalyse der Zelllinie SEG-1 zeigt ein anderes Bild. Anhand des mitosespezifischen Markers p-H3 ist eine kontinuierliche Abnahme der Mitoserate über die Zeit zu sehen (siehe 4.5.2). Die Zellen beginnen nach 24 h LBH589-Behandlung vermehrt in der G1-Phase zu akkumulieren. Dieses Verhalten ist durch die deutliche Induktion von p21<sup>waf1</sup> zum gleichen Zeitpunkt zu erklären. Schließlich ist p21<sup>waf1</sup> bekannter Maßen notwendig für den p53-vermittelten G1-Arrest in Tumorzellen<sup>163</sup>. Die Möglichkeit zur notwendigen DNA-Reparatur bei nachweisbaren DNA-Doppelstrangbrüchen bekommen die Zellen der Zelllinie SEG-1 durch die Anwesenheit von p53. Im weiteren Verlauf kommt es nach 48 h bei gleichzeitigem Rückgang der p21<sup>waf1</sup>-Konzentration zu einer Fortsetzung des Zellzyklus, aber nicht zu einem Eintreten in die Mitose, da p-H3 nicht nach zu weisen ist. Gleichzeitig findet Apoptose erstmalig signifikant statt. Der Anteil der Zellen in der S-Phase nimmt deutlich zu. Es ist anzunehmen, dass die Zellen aus der S- und G2-Phase heraus Apoptose begehen. Bei Fortschreiten des Zellzyklus ist eine Akkumulation der SEG-1-Zellen am G2-M-Checkpoint zu erwarten. Diese Hypothese bedarf einer Überprüfung, da keine Zellzyklusanalyse nach 72 h und später durchgeführt wurde.

TE-7



**Abb. 5.1 Schema über die Signalkaskaden unter der Wirkung des HDACi LBH589 in der Zelllinie TE-7.** Schwarze Pfeile: aktiviert/induziert/führt zu; Balken (grau): inhibiert; grau unterlegt und durchgestrichen: Protein nicht exprimiert/ wird abgebaut. Einzelheiten siehe Text.

## SEG-1



**Abb. 5.2 Schema über die Signalkaskaden unter der Wirkung des HDACI LBH589 in der Zelllinie SEG-1.** Schwarze Pfeile: aktiviert/induziert/führt zu; schwarzer Pfeil neben Protein: Konzentrationszu- bzw. -abnahme. Balken (schwarz): inhibiert/reprimiert. \* Hypothese, bei fehlenden Daten zur Zellzyklusanalyse > 48 h. Einzelheiten siehe Text.

## 5.4 Zusammenfassung

Nach kardiovaskulären Erkrankungen sind maligne Tumoren die zweithäufigste Todesursache in der Bundesrepublik Deutschland und deren erfolgreiche Therapie daher von großem gesellschaftlichem und wirtschaftlichem Interesse. Dabei stellen gerade das Lungen- und das Ösophaguskarzinom mit ihren weiterhin unbefriedigenden Therapiemöglichkeiten eine große Herausforderung dar. Bei der Entwicklung neuer Chemotherapeutika konnten mit der Substanzklasse der Histondeacetylase-Inhibitoren sehr vielversprechende Ergebnisse bei einer Vielzahl von Tumorentitäten erzielt werden, so auch beim Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinom (NSCLC) und dem Plattenepithelkarzinom des Ösophagus.

Die vorliegende Arbeit untersucht die Möglichkeiten der Apoptoseinduktion mit dem Histondeacetylase-Inhibitor LBH589 (Panobinostat) in Zellen der Zelllinie TE-7 (Plattenepithelkarzinom des Ösophagus) und der Zelllinie SEG-1 (NSCLC). Für diese Studie wurden verschiedene molekularbiologische und biochemische Methoden, wie Western Blot, Durchflusszytometrie (Annexin-V, Zellzyklusanalyse), *Real-Time* PCR und andere, angewandt.

Die Ergebnisse zeigen, dass es im Vergleich zur Zelllinie TE-7, die durch ein Funktionsverlust des p53-Gens gekennzeichnet ist, in der p53-Wildtyp Zelllinie SEG-1 unter dem Einfluss von LBH589 zu einer sehr viel geringer ausgeprägten und später einsetzenden Apoptoseantwort kommt. Desweiteren bewirkt LBH589 eine Abnahme in der Chk1-Konzentration in beiden Zelllinien, die auf jeweils unterschiedliche Regulationsmechanismen zurückzuführen ist, aber entscheidenden Einfluss auf das Ausmaß der Apoptoseinduktion nimmt.

Die Zelllinie TE-7 zeichnet sich durch einen Verlust des p53-Gens aus. Mutationen und somit Funktionsverluste von p53 sind ein häufiges Phänomen in Tumorzellen. Die Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, da p53 als starker Induktor für p21<sup>waf1</sup> in dieser Zelllinie fehlt, kann es unter dem Einfluss von LBH589 nur zu einer geringen Zunahme an p21<sup>waf1</sup> kommen. Diese Zunahme scheint ausschließlich durch die HDACI-spezifische Wirkung auf die p21<sup>waf1</sup>-Expression bedingt zu sein. Der Zelllinie TE-7 fehlen somit die zwei wichtigsten Regulatorproteine, um adäquat eine antiproliferative und antiapoptotische Stressantwort auf die LBH589-Behandlung generieren zu können. In dieser Situation, einer bereits gestörten Zellzyklusregulation, ist eine intakte

Chk1-Funktion von vitaler Notwendigkeit. In der Zelllinie TE-7 ist nach 6 h LBH589-Behandlung die Aktivierung von Chk1 nachweisbar (p-Chk1). Die Zellen reduzieren daraufhin ihre mitotische Aktivität, es kann eine Akkumulation der Zellen in der G2-Phase nachgewiesen werden. Dies erscheint sinnvoll, damit die Zellen Zeit für die Wiederherstellung der genetischen und zellulären Integrität bekommen. Nach 24 h Behandlungsdauer kommt es jedoch zu einer Abnahme der Chk1-, und entsprechend der p-Chk1-Konzentration in den Zellen. Es konnte in dieser Arbeit gezeigt werden, dass dieser Rückgang hauptsächlich (70 %) durch eine LBH589-abhängige Steigerung der proteosomalen Degradation verursacht ist. Zu etwa 30 % ist die transkriptionelle Chk1-Herunterregulation dafür verantwortlich. Der Zelllinie TE-7 wird mit dem Chk1-Protein die letzte Kontrollmöglichkeit über den Zellzyklus entzogen. Die Zellen treten daraufhin wieder vermehrt in die Mitose ein. Bei gleichzeitig nachweisbaren DNA-Schäden kann die Integrität der DNA nicht mehr aufrecht erhalten werden. Es kommt zur Apoptose aus der Mitose heraus, zur sogenannten mitotischen Katastrophe. Das Ergebnis dieser Studie ist der Nachweis einer signifikanten Apoptoseinduktion mit dem Histondeacetylase-Inhibitor LBH589 in der Zelllinie TE-7 nach 24 und 48 h Behandlungsdauer, mit einer Apoptoserate von 33 bzw. 62 %. Ursächlich sind dabei der extrinsische als auch der intrinsische Weg der Apoptose beteiligt, resultierend in einer deutlichen Aktivierung der Effektorcaspase 3 sowie vermutlich der Mechanismus der mitotischen Katastrophe. Der bekannte Resistenzmechanismus gegen HDACI, welcher sich durch eine erhöhte Konzentration des antiapoptotischen Bcl-2 auszeichnet, steht dieser Zelllinie nicht zur Verfügung.

Weiter zeigen die Ergebnisse dieser Studie in der p53-Wildtyp Zelllinie SEG-1 wie erwartet eine deutliche p21<sup>waf1</sup>-Hochregulation unter LBH589-Applikation. Die p53-Konzentration nimmt im geringen Umfang um 20 % des Kontrollwertes zu. Dieser Zelllinie stehen p21<sup>waf1</sup> und p53 als wichtige Regulatoren des Zellzyklus und der Stressantwort zur Verfügung. Es kommt unter dem Einfluss von LBH589 ohne vorherige Aktivierung zu einer Herunterregulation der Chk1. Als Grund dafür stellte sich eine p53-abhängige transkriptionelle Herunterregulation heraus, zu verstehen als ein negativer Feedbackmechanismus. Die beiden Regulatorproteine p21<sup>waf1</sup> und p53 bewirken weiterhin eine Reduktion der mitotischen Aktivität. Nachweislich akkumulieren die Zellen in der G1-Phase und bekommen dadurch Zeit die Integrität der DNA und der Zelle wieder herzustellen. Denn auch in der Zelllinie SEG-1 kann unter LBH589 eine Aktivierung des

extrinsischen und intrinsischen Weges der Apoptose aufgezeigt werden. Das Ausmaß der Aktivierung ist aber deutlich geringer im Vergleich zu der Zelllinie TE-7, nach 24 h findet eine minimale Aktivierung der Caspase 3 statt. Zu diesem Zeitpunkt ist auch - in geringem Maße - eine DNA-Fragmentation darstellbar. Weiterhin konnte in der Zelllinie SEG-1 der bereits beschriebene Bcl-2-Resistenzmechanismus nachgewiesen werden. Nach 48 h Behandlungsdauer kommt es jedoch zu einer Abnahme der p21<sup>waf1</sup>-Konzentration. Möglicherweise bewirkt hier der HDACI LBH589 eine gesteigerte proteasomale Degradation. Als Ergebnis dieser Studie lässt sich festhalten, dass die Zelllinie SEG-1 auf Grund einer funktionierenden Zellzykluskontrolle und des Bcl-2-Resistenzmechanismus vorerst resistent für die LBH589-Behandlung ist. Im Verlauf bewirkt der Abfall der p21<sup>waf1</sup>-Konzentration eine signifikante Apoptoseinduktion nach 48 h mit einer geringen Rate von 14,5 %.

## 5.5 Schlussfolgerung

Die Ergebnisse dieser Studie zeigen, dass die Therapieeffizienz des HDACI LBH589 abhängig vom p53-Status der jeweiligen Zelllinie ist. Bei Vorliegen eines funktionstüchtigen p53 bleibt der Tumorzelle die Fähigkeit erhalten der Einwirkung von LBH589 die Induktion einer antiproliferativen und antiapoptotischen Stressantwort entgegen zu setzen. Wissenschaftlich anerkannt ist, dass bei etwa 50 % der Tumoren das p53-Gen mutiert ist. Folglich erscheint der selektive Einsatz von LBH589 bei diesen Malignitäten sinnvoll. Die wichtigste Voraussetzung für die hohen Apoptoseraten in der Zelllinie TE-7 ist die LBH589 induzierte proteasomale Degradation der Checkpointkinase 1 und nicht die Induktion der p21<sup>waf1</sup>-Expression. Es ist bekannt, dass hohe Chk1-Konzentrationen in Tumorzellen mit einem p53-Funktionsverlust zu geringeren Apoptoseraten führen und somit Chk1-Inhibitoren ebenfalls einen sinnvollen Therapieansatz darstellen. Folglich vereint der HDACI LBH589 mehrere wertvolle Therapieansätze in einer Substanz. Zur Verbesserung der Studienlage müssen die Aussagen dieser Arbeit noch mit weiteren Experimenten bestätigt werden. Wichtig wäre die Information, ob LBH589 in der Zelllinie SEG-1 nicht zu einem späteren Zeitpunkt ebenfalls hohe Apoptoseraten hervorruft. Auch müsste mittels selektiver *Knock-Outs* die Rolle einzelner Proteine, wie p53 und p21<sup>waf1</sup>, kontrolliert werden. In wie fern die Ergebnisse dieser Arbeit auf andere Tumorzelllinien zu übertragen sind, oder ob diese Ergebnisse spezifisch für die Zelllinien TE-7 und SEG-1 bleiben, bedarf wei-

terer experimenteller Untersuchung. Dennoch geben die Resultate dieser Studie Anlass zur Hoffnung, dass mit dem Histondeacetylase-Inhibitor LBH589 eine neue effiziente chemotherapeutische Substanz im Kampf gegen maligne Krebserkrankungen entwickelt wurde.

## 5.6 Limitationen

Die Ausgangssituation dieser Studie September 2007 war die Analyse des Histondeacetylase-Inhibitors LBH589 bzgl. seiner Fähigkeit zur Apoptoseinduktion in den beiden Barrettkarzinomzelllinien TE-7 und SEG-1. Fast gleichzeitig mit dem Ende der Datenerhebung Sommer 2008 wurde offiziell, dass diese beiden Zelllinien seit Jahrzehnten fälschlicher Weise in der Wissenschaft für die Forschung am Barrettkarzinom verwendet wurden. Bei der Zelllinie TE-7 handelt es sich um eine Zelllinie des Plattenepithelkarzinoms des Ösophagus, SEG-1 entspricht einer Zelllinie des Nicht-kleinzelligen Lungenkarzinoms<sup>164, 165</sup>. Deshalb wurden in dieser Arbeit Zelllinien aus zwei unterschiedlichen Ursprungsgeweben miteinander verglichen, welches dem hohen Anspruch der heutigen Wissenschaft nicht gänzlich gerecht wird. Mit dem Fokus auf die molekulare Ebene und dem unterschiedlichen p53-Status der beiden Zelllinien soll dieser Sachverhalt ein wenig an Gewicht verlieren. Auch werden in dieser Studie tumorspezifische Wirkungen untersucht, die einer weiteren Analyse bedürfen.

## 6 Literaturverzeichnis

1. Gondos A, Holleczeck B, Arndt V, Stegmaier C, Ziegler H, Brenner H. Trends in population-based cancer survival in Germany: to what extent does progress reach older patients?  
1. Ann Oncol 2007;18(7):1253-1259.
2. Robert Koch-Institut 2. Verbreitung von Krebserkrankungen in Deutschland - Entwicklung der Prävalenzen zwischen 1990 und 2010. 2010
3. Husmann G., Kaatsch P., Katalinic A., Bertz J. Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends. 7. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg). Berlin. 2010
4. Geggie PH. Prognosis of common cancers. Can Fam Physician 1990;36:955-959.
5. Goeckenjan G.et al. Prävention, Diagnostik, Therapie und Nachsorge des Lungenkarzinoms Interdisziplinäre S3-Leitlinie der Deutschen Gesellschaft für Pneumologie und Beatmungsmedizin und der Deutschen Krebsgesellschaft. Georg Thieme Verlag KG. In press.
6. Neville AJ, Kuruvilla MS. Lung cancer 4. Clin Evid (Online ) 2010;2010.
7. Campbell NP, Villaflor VM. Neoadjuvant treatment of esophageal cancer. World J Gastroenterol 2010;16(30):3793-3803.
8. Sinkovics JG, Horvath JC. Role of apoptosis in health and disease. JAMA 1998;279(21):1699.
9. Hetts SW. To die or not to die: an overview of apoptosis and its role in disease. JAMA 1998;279(4):300-307.
10. Green DR, Evan GI. A matter of life and death 1. Cancer Cell 2002;1(1):19-30.
11. Zornig M, Hueber A, Baum W, Evan G. Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. 19. Biochim Biophys Acta 2001;1551(2):F1-37.
12. Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. Cancer 1994;73(8):2013-2026.

13. Nowell PC. The clonal evolution of tumor cell populations. *Science* 1976;194(4260):23-28.
14. Vogelstein B, Kinzler KW. The multistep nature of cancer. *Trends Genet* 1993;9(4):138-141.
15. Seemayer TA, Cavenee WK. Molecular mechanisms of oncogenesis. *Lab Invest* 1989;60(5):585-599.
16. Mitchell CD. Recessive oncogenes, antioncogenes and tumour suppression. *Br Med Bull* 1991;47(1):136-156.
17. Weinberg RA. The molecular basis of oncogenes and tumor suppressor genes. *Ann N Y Acad Sci* 1995;758:331-338.
18. Hahn WC, Weinberg RA. Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med* 2002;347(20):1593-1603.
19. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones PA. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature* 2004;429(6990):457-463.
20. Esteller M, Herman JG. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J Pathol* 2002;196(1):1-7.
21. Esteller M. CpG island hypermethylation and tumor suppressor genes: a booming present, a brighter future. *Oncogene* 2002;21(35):5427-5440.
22. Lee OJ, Schneider-Stock R, McChesney PA et al. Hypermethylation and loss of expression of glutathione peroxidase-3 in Barrett's tumorigenesis. *Neoplasia* 2005;7(9):854-861.
23. Iizuka M, Smith MM. Functional consequences of histone modifications. *Curr Opin Genet Dev* 2003;13(2):154-160.
24. Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A et al. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet* 2005;37(4):391-400.
25. Jenuwein T, Allis CD. Translating the histone code. *Science* 2001;293(5532):1074-1080.
26. Polo SE, Almouzni G. Histone metabolic pathways and chromatin assembly factors as proliferation markers. *Cancer Lett* 2005;220(1):1-9.
27. Vidanes GM, Bonilla CY, Toczyski DP. Complicated tails: histone modifications and the DNA damage response. *Cell* 2005;121(7):973-976.

28. Lin HY, Chen CS, Lin SP, Weng JR, Chen CS. Targeting histone deacetylase in cancer therapy. *Med Res Rev* 2006;26(4):397-413.
29. Minucci S, Pelicci PG. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer* 2006;6(1):38-51.
30. Yasui W, Oue N, Ono S, Mitani Y, Ito R, Nakayama H. Histone acetylation and gastrointestinal carcinogenesis. *Ann N Y Acad Sci* 2003;983:220-231.
31. Fraga MF, Ballestar E, Villar-Garea A et al. Loss of acetylation at Lys16 and trimethylation at Lys20 of histone H4 is a common hallmark of human cancer. *Nat Genet* 2005;37(4):391-400.
32. Richon VM, O'Brien JP. Histone deacetylase inhibitors: a new class of potential therapeutic agents for cancer treatment. *Clin Cancer Res* 2002;8(3):662-664.
33. Peart MJ, Tainton KM, Ruefli AA et al. Novel mechanisms of apoptosis induced by histone deacetylase inhibitors. *Cancer Res* 2003;63(15):4460-4471.
34. Tang YA, Wen WL, Chang JW et al. A novel histone deacetylase inhibitor exhibits antitumor activity via apoptosis induction, F-actin disruption and gene acetylation in lung cancer. *PLoS One* 2010;5(9):e12417.
35. Marks P, Rifkind RA, Richon VM, Breslow R, Miller T, Kelly WK. Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat Rev Cancer* 2001;1(3):194-202.
36. Johnstone RW. Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nat Rev Drug Discov* 2002;1(4):287-299.
37. Miller TA, Witter DJ, Belvedere S. Histone deacetylase inhibitors. *J Med Chem* 2003;46(24):5097-5116.
38. Mai A, Massa S, Rotili D et al. Histone deacetylation in epigenetics: an attractive target for anticancer therapy. *Med Res Rev* 2005;25(3):261-309.
39. Haggarty SJ, Koeller KM, Wong JC, Grozinger CM, Schreiber SL. Domain-selective small-molecule inhibitor of histone deacetylase 6 (HDAC6)-mediated tubulin deacetylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2003;100(8):4389-4394.
40. Mai A, Massa S, Pezzi R, Rotili D, Loidl P, Brosch G. Discovery of (aryloxopropenyl)pyrrolyl hydroxyamides as selective inhibitors of class IIa histone deacetylase homologue HD1-A. *J Med Chem* 2003;46(23):4826-4829.
41. Park JH, Jung Y, Kim TY et al. Class I histone deacetylase-selective novel synthetic inhibitors potently inhibit human tumor proliferation. *Clin Cancer Res* 2004;10(15):5271-5281.

42. Heltweg B, Dequiedt F, Marshall BL et al. Subtype selective substrates for histone deacetylases. *J Med Chem* 2004;47(21):5235-5243.
43. Bertrand P. Inside HDAC with HDAC inhibitors. *Eur J Med Chem* 2010;45(6):2095-2116.
44. Hubbert C, Guardiola A, Shao R et al. HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase. *Nature* 2002;417(6887):455-458.
45. Bali P, Pranpat M, Bradner J et al. Inhibition of histone deacetylase 6 acetylates and disrupts the chaperone function of heat shock protein 90: a novel basis for antileukemia activity of histone deacetylase inhibitors. *J Biol Chem* 2005;280(29):26729-26734.
46. Gaughan L, Logan IR, Cook S, Neal DE, Robson CN. Tip60 and histone deacetylase 1 regulate androgen receptor activity through changes to the acetylation status of the receptor. *J Biol Chem* 2002;277(29):25904-25913.
47. Ito K, Yamamura S, Essilfie-Quaye S et al. Histone deacetylase 2-mediated deacetylation of the glucocorticoid receptor enables NF-kappaB suppression. *J Exp Med* 2006;203(1):7-13.
48. Wang C, Fu M, Angeletti RH et al. Direct acetylation of the estrogen receptor alpha hinge region by p300 regulates transactivation and hormone sensitivity. *J Biol Chem* 2001;276(21):18375-18383.
49. Gobinet J, Carascossa S, Cavailles V, Vignon F, Nicolas JC, Jalaguier S. SHP represses transcriptional activity via recruitment of histone deacetylases. *Biochemistry* 2005;44(16):6312-6320.
50. Glozak MA, Sengupta N, Zhang X, Seto E. Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene* 2005;363:15-23.
51. Costanzo A, Merlo P, Pediconi N et al. DNA damage-dependent acetylation of p73 dictates the selective activation of apoptotic target genes. *Mol Cell* 2002;9(1):175-186.
52. Yang WM, Inouye C, Zeng Y, Bearss D, Seto E. Transcriptional repression by YY1 is mediated by interaction with a mammalian homolog of the yeast global regulator RPD3. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1996;93(23):12845-12850.
53. Mal A, Sturniolo M, Schiltz RL, Ghosh MK, Harter ML. A role for histone deacetylase HDAC1 in modulating the transcriptional activity of MyoD: inhibition of the myogenic program. *EMBO J* 2001;20(7):1739-1753.
54. Martinez-Balbas MA, Bauer UM, Nielsen SJ, Brehm A, Kouzarides T. Regulation of E2F1 activity by acetylation. *EMBO J* 2000;19(4):662-671.

55. Zheng G, Yang YC. Sumoylation and acetylation play opposite roles in the transactivation of PLAG1 and PLAGL2. *J Biol Chem* 2005;280(49):40773-40781.
56. Bereshchenko OR, Gu W, Dalla-Favera R. Acetylation inactivates the transcriptional repressor BCL6. *Nat Genet* 2002;32(4):606-613.
57. Jeong JW, Bae MK, Ahn MY et al. Regulation and destabilization of HIF-1 $\alpha$  by ARD1-mediated acetylation. *Cell* 2002;111(5):709-720.
58. Nguyen DX, Baglia LA, Huang SM, Baker CM, McCance DJ. Acetylation regulates the differentiation-specific functions of the retinoblastoma protein. *EMBO J* 2004;23(7):1609-1618.
59. Nemoto S, Fergusson MM, Finkel T. SIRT1 functionally interacts with the metabolic regulator and transcriptional coactivator PGC-1 $\alpha$ . *J Biol Chem* 2005;280(16):16456-16460.
60. Cleary J, Sitwala KV, Khodadoust MS et al. p300/CBP-associated factor drives DEK into interchromatin granule clusters. *J Biol Chem* 2005;280(36):31760-31767.
61. Pasheva E, Sarov M, Bidjekov K et al. In vitro acetylation of HMGB-1 and -2 proteins by CBP: the role of the acidic tail. *Biochemistry* 2004;43(10):2935-2940.
62. Luhrs H, Hock R, Schaubert J et al. Modulation of HMG-N2 binding to chromatin by butyrate-induced acetylation in human colon adenocarcinoma cells. *Int J Cancer* 2002;97(5):567-573.
63. Thevenet L, Mejean C, Moniot B et al. Regulation of human SRY subcellular distribution by its acetylation/deacetylation. *EMBO J* 2004;23(16):3336-3345.
64. Yuan ZL, Guan YJ, Chatterjee D, Chin YE. Stat3 dimerization regulated by reversible acetylation of a single lysine residue. *Science* 2005;307(5707):269-273.
65. Simonsson M, Heldin CH, Ericsson J, Gronroos E. The balance between acetylation and deacetylation controls Smad7 stability. *J Biol Chem* 2005;280(23):21797-21803.
66. Wolf D, Rodova M, Miska EA, Calvet JP, Kouzarides T. Acetylation of beta-catenin by CREB-binding protein (CBP). *J Biol Chem* 2002;277(28):25562-25567.
67. Cohen HY, Lavu S, Bitterman KJ et al. Acetylation of the C terminus of Ku70 by CBP and PCAF controls Bax-mediated apoptosis. *Mol Cell* 2004;13(5):627-638.
68. Blander G, Zalle N, Daniely Y, Taplick J, Gray MD, Oren M. DNA damage-induced translocation of the Werner helicase is regulated by acetylation. *J Biol Chem* 2002;277(52):50934-50940.

69. Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* 2006;5(9):769-784.
70. Rasheed WK, Johnstone RW, Prince HM. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. *Expert Opin Investig Drugs* 2007;16(5):659-678.
71. Glozak MA, Seto E. Histone deacetylases and cancer. *Oncogene* 2007;26(37):5420-5432.
72. Dokmanovic M, Clarke C, Marks PA. Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives. *Mol Cancer Res* 2007;5(10):981-989.
73. Xu WS, Parmigiani RB, Marks PA. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene* 2007;26(37):5541-5552.
74. Jones PA, Baylin SB. The epigenomics of cancer. *Cell* 2007;128(4):683-692.
75. Blackwell L, Norris J, Suto CM, Janzen WP. The use of diversity profiling to characterize chemical modulators of the histone deacetylases. *Life Sci* 2008;82(21-22):1050-1058.
76. Moradei O, Vaisburg A, Martell RE. Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy: new compounds and clinical update of benzamide-type agents. *Curr Top Med Chem* 2008;8(10):841-858.
77. Shankar S, Srivastava RK. Histone deacetylase inhibitors: mechanisms and clinical significance in cancer: HDAC inhibitor-induced apoptosis. *Adv Exp Med Biol* 2008;615:261-298.
78. Gialitakis M, Kretsovali A, Spilianakis C et al. Coordinated changes of histone modifications and HDAC mobilization regulate the induction of MHC class II genes by Trichostatin A. *Nucleic Acids Res* 2006;34(3):765-772.
79. Khan AN, Tomasi TB. Histone deacetylase regulation of immune gene expression in tumor cells. *Immunol Res* 2008;40(2):164-178.
80. Burgess A, Ruefli A, Beamish H et al. Histone deacetylase inhibitors specifically kill nonproliferating tumour cells. *Oncogene* 2004;23(40):6693-6701.
81. Ungerstedt JS, Sowa Y, Xu WS et al. Role of thioredoxin in the response of normal and transformed cells to histone deacetylase inhibitors. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(3):673-678.
82. Gui CY, Ngo L, Xu WS, Richon VM, Marks PA. Histone deacetylase (HDAC) inhibitor activation of p21WAF1 involves changes in promoter-associated proteins, including HDAC1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2004;101(5):1241-1246.

83. Nakata S, Yoshida T, Horinaka M, Shiraishi T, Wakada M, Sakai T. Histone deacetylase inhibitors upregulate death receptor 5/TRAIL-R2 and sensitize apoptosis induced by TRAIL/APO2-L in human malignant tumor cells. *Oncogene* 2004;23(37):6261-6271.
84. Insinga A, Monestiroli S, Ronzoni S et al. Inhibitors of histone deacetylases induce tumor-selective apoptosis through activation of the death receptor pathway. *Nat Med* 2005;11(1):71-76.
85. Rosato RR, Maggio SC, Almenara JA et al. The histone deacetylase inhibitor LAQ824 induces human leukemia cell death through a process involving XIAP down-regulation, oxidative injury, and the acid sphingomyelinase-dependent generation of ceramide. *Mol Pharmacol* 2006;69(1):216-225.
86. Inoue S, Harper N, Walewska R, Dyer MJ, Cohen GM. Enhanced Fas-associated death domain recruitment by histone deacetylase inhibitors is critical for the sensitization of chronic lymphocytic leukemia cells to TRAIL-induced apoptosis. *Mol Cancer Ther* 2009;8(11):3088-3097.
87. Wood TE, Dalili S, Simpson CD et al. Selective inhibition of histone deacetylases sensitizes malignant cells to death receptor ligands. *Mol Cancer Ther* 2010;9(1):246-256.
88. Hwang JJ, Kim YS, Kim MJ, Kim DE, Jeong IG, Kim CS. Histone deacetylase inhibitor potentiates anticancer effect of docetaxel via modulation of Bcl-2 family proteins and tubulin in hormone refractory prostate cancer cells. *J Urol* 2010;184(6):2557-2564.
89. Chen J, Fiskus W, Eaton K et al. Cotreatment with BCL-2 antagonist sensitizes cutaneous T-cell lymphoma to lethal action of HDAC7-Nur77-based mechanism. *Blood* 2009;113(17):4038-4048.
90. Robbins AR, Jablonski SA, Yen TJ et al. Inhibitors of histone deacetylases alter kinetochore assembly by disrupting pericentromeric heterochromatin. *Cell Cycle* 2005;4(5):717-726.
91. Zhang XH, Rao M, Loprieato JA et al. Aurora A, Aurora B and survivin are novel targets of transcriptional regulation by histone deacetylase inhibitors in non-small cell lung cancer. *Cancer Biol Ther* 2008;7(9):1388-1397.
92. Xu W, Ngo L, Perez G, Dokmanovic M, Marks PA. Intrinsic apoptotic and thioredoxin pathways in human prostate cancer cell response to histone deacetylase inhibitor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2006;103(42):15540-15545.
93. Hideshima T, Bradner JE, Wong J et al. Small-molecule inhibition of proteasome and aggresome function induces synergistic antitumor activity in multiple myeloma. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(24):8567-8572.

94. Chen S, Sang N. Histone deacetylase inhibitors: the epigenetic therapeutics that repress hypoxia-inducible factors. *J Biomed Biotechnol* 2011;2011:197946.
95. Tan J, Cang S, Ma Y, Petrillo RL, Liu D. Novel histone deacetylase inhibitors in clinical trials as anti-cancer agents. *J Hematol Oncol* 2010;3:5.
96. Hauschild A, Trefzer U, Garbe C et al. Multicenter phase II trial of the histone deacetylase inhibitor pyridylmethyl-N-{4-[(2-aminophenyl)-carbamoyl]-benzyl}-carbamate in pretreated metastatic melanoma. *Melanoma Res* 2008;18(4):274-278.
97. Garcia-Manero G, Assouline S, Cortes J et al. Phase 1 study of the oral isotype specific histone deacetylase inhibitor MGCD0103 in leukemia. *Blood* 2008;112(4):981-989.
98. Galanis E, Jaeckle KA, Maurer MJ et al. Phase II trial of vorinostat in recurrent glioblastoma multiforme: a north central cancer treatment group study. *J Clin Oncol* 2009;27(12):2052-2058.
99. Marks PA, Breslow R. Dimethyl sulfoxide to vorinostat: development of this histone deacetylase inhibitor as an anticancer drug. *Nat Biotechnol* 2007;25(1):84-90.
100. Duvic M, Vu J. Vorinostat: a new oral histone deacetylase inhibitor approved for cutaneous T-cell lymphoma. *Expert Opin Investig Drugs* 2007;16(7):1111-1120.
101. Whittaker SJ, Demierre MF, Kim EJ et al. Final results from a multicenter, international, pivotal study of romidepsin in refractory cutaneous T-cell lymphoma. *J Clin Oncol* 2010;28(29):4485-4491.
102. Marks PA, Xu WS. Histone deacetylase inhibitors: Potential in cancer therapy. *J Cell Biochem* 2009;107(4):600-608.
103. Carafa V, Nebbioso A, Altucci L. Histone deacetylase inhibitors: recent insights from basic to clinical knowledge & patenting of anti-cancer actions. *Recent Pat Anticancer Drug Discov* 2011;6(1):131-145.
104. Prince HM, Bishton MJ, Johnstone RW. Panobinostat (LBH589): a potent pan-deacetylase inhibitor with promising activity against hematologic and solid tumors. *Future Oncol* 2009;5(5):601-612.
105. Shao W.. Potent anticancer activity of the pan-deacetylase inhibitor panobinostat (LBH589) as a single agent in in vitro and in vivo tumor models. 99th American Association of Cancer Research Annual Meeting, April 12-16, San Diego CA. In press.
106. Maiso P, Carvajal-Vergara X, Ocio EM et al. The histone deacetylase inhibitor LBH589 is a potent antimyeloma agent that overcomes drug resistance. *Cancer Res* 2006;66(11):5781-5789.

107. Catley L, Weisberg E, Kiziltepe T et al. Aggresome induction by proteasome inhibitor bortezomib and alpha-tubulin hyperacetylation by tubulin deacetylase (TDAC) inhibitor LBH589 are synergistic in myeloma cells. *Blood* 2006;108(10):3441-3449.
108. Shao W, Growney JD, Feng Y et al. Activity of deacetylase inhibitor panobinostat (LBH589) in cutaneous T-cell lymphoma models: Defining molecular mechanisms of resistance. *Int J Cancer* 2010;127(9):2199-2208.
109. Shao W.. Efficacy of panobinostat (LBH589) in CTCL cell lines and a murine xenograft model: defining molecular pathways of panobinostat activity in CTCL. *Blood (ASH Annual Meeting Abstracts)*. In press.
110. Shao W.. Evaluation of the antitumor activity of LBH589 antitumor activity in HER2 + breast cancer models and of potential synergy in combination with HER2 targeted therapy. *ASCO Breast Cancer Symposium*, September 5-7 2007, Washington, DC. In press.
111. Wang Y. Potent anticancer activity of the deacetylase inhibitor panobinostat (LBH589) in colon cancer cell lines and patient-derived primary colon cancer xenografts. 99th American Association of Cancer Research Annual Meeting, April 12-16, 2008, San Diego CA. In press.
112. Brazelle W, Krehling JM, Gemmer J et al. Histone deacetylase inhibitors downregulate checkpoint kinase 1 expression to induce cell death in non-small cell lung cancer cells. *PLoS One* 2010;5(12):e14335.
113. Sureda A. YAB-YDea. Final analysis: Phase II study of oral panobinostat in relapsed/refractory Hodgkin lymphoma patients following autologous hematopoietic stem cell transplant. 52nd ASH Annual Meeting and Exposition. In press.
114. Lukas J, Lukas C, Bartek J. Mammalian cell cycle checkpoints: signalling pathways and their organization in space and time. *DNA Repair (Amst)* 2004;3(8-9):997-1007.
115. Takai H, Tominaga K, Motoyama N et al. Aberrant cell cycle checkpoint function and early embryonic death in Chk1(-/-) mice. *Genes Dev* 2000;14(12):1439-1447.
116. Lukas C, Bartkova J, Latella L et al. DNA damage-activated kinase Chk2 is independent of proliferation or differentiation yet correlates with tissue biology. *Cancer Res* 2001;61(13):4990-4993.
117. Zhao H, Piwnica-Worms H. ATR-mediated checkpoint pathways regulate phosphorylation and activation of human Chk1. *Mol Cell Biol* 2001;21(13):4129-4139.
118. Stracker TH, Theunissen JW, Morales M, Petrini JH. The Mre11 complex and the metabolism of chromosome breaks: the importance of communicating and holding things together. *DNA Repair (Amst)* 2004;3(8-9):845-854.

119. Guo Z, Kumagai A, Wang SX, Dunphy WG. Requirement for Atr in phosphorylation of Chk1 and cell cycle regulation in response to DNA replication blocks and UV-damaged DNA in *Xenopus* egg extracts. *Genes Dev* 2000;14(21):2745-2756.
120. Kastan MB, Bartek J. Cell-cycle checkpoints and cancer. *Nature* 2004;432(7015):316-323.
121. Zhou BB, Elledge SJ. The DNA damage response: putting checkpoints in perspective. *Nature* 2000;408(6811):433-439.
122. Gottifredi V, Karni-Schmidt O, Shieh SS, Prives C. p53 down-regulates CHK1 through p21 and the retinoblastoma protein. *Mol Cell Biol* 2001;21(4):1066-1076.
123. Damia G, Sanchez Y, Erba E, Broggin M. DNA Damage Induces p53-dependent Down-regulation of hCHK1. *J Biol Chem* 2001;276(14):10641-10645.
124. Peng CY, Graves PR, Thoma RS, Wu Z, Shaw AS, Piwnicka-Worms H. Mitotic and G2 checkpoint control: regulation of 14-3-3 protein binding by phosphorylation of Cdc25C on serine-216. *Science* 1997;277(5331):1501-1505.
125. Yarden RI, Pardo-Reoyo S, Sgagias M, Cowan KH, Brody LC. BRCA1 regulates the G2/M checkpoint by activating Chk1 kinase upon DNA damage. *Nat Genet* 2002;30(3):285-289.
126. Sorensen CS, Hansen LT, Dziegielewski J et al. The cell-cycle checkpoint kinase Chk1 is required for mammalian homologous recombination repair. *Nat Cell Biol* 2005;7(2):195-201.
127. Shieh SY, Taya Y, Prives C. DNA damage-inducible phosphorylation of p53 at N-terminal sites including a novel site, Ser20, requires tetramerization. *EMBO J* 1999;18(7):1815-1823.
128. Shieh SY, Ahn J, Tamai K, Taya Y, Prives C. The human homologs of checkpoint kinases Chk1 and Cds1 (Chk2) phosphorylate p53 at multiple DNA damage-inducible sites. *Genes Dev* 2000;14(3):289-300.
129. Chehab NH, Malikzay A, Stavridi ES, Halazonetis TD. Phosphorylation of Ser-20 mediates stabilization of human p53 in response to DNA damage. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1999;96(24):13777-13782.
130. Strausfeld U, Labbe JC, Fesquet D et al. Dephosphorylation and activation of a p34cdc2/cyclin B complex in vitro by human CDC25 protein. *Nature* 1991;351(6323):242-245.

131. Mhaweck P. 14-3-3 proteins--an update. *Cell Res* 2005;15(4):228-236.
132. Mailand N, Falck J, Lukas C et al. Rapid destruction of human Cdc25A in response to DNA damage. *Science* 2000;288(5470):1425-1429.
133. Chen MS, Ryan CE, Piwnica-Worms H. Chk1 kinase negatively regulates mitotic function of Cdc25A phosphatase through 14-3-3 binding. *Mol Cell Biol* 2003;23(21):7488-7497.
134. Tse AN, Carvajal R, Schwartz GK. Targeting checkpoint kinase 1 in cancer therapeutics. *Clin Cancer Res* 2007;13(7):1955-1960.
135. Sorensen CS, Syljuasen RG, Falck J et al. Chk1 regulates the S phase checkpoint by coupling the physiological turnover and ionizing radiation-induced accelerated proteolysis of Cdc25A. *Cancer Cell* 2003;3(3):247-258.
136. Lobrich M, Jeggo PA. The impact of a negligent G2/M checkpoint on genomic instability and cancer induction. *Nat Rev Cancer* 2007;7(11):861-869.
137. Taylor WR, Stark GR. Regulation of the G2/M transition by p53. *Oncogene* 2001;20(15):1803-1815.
138. Tse AN, Schwartz GK. Potentiation of cytotoxicity of topoisomerase I poison by concurrent and sequential treatment with the checkpoint inhibitor UCN-01 involves disparate mechanisms resulting in either p53-independent clonogenic suppression or p53-dependent mitotic catastrophe. *Cancer Res* 2004;64(18):6635-6644.
139. Tse AN, Rendahl KG, Sheikh T et al. CHIR-124, a novel potent inhibitor of Chk1, potentiates the cytotoxicity of topoisomerase I poisons in vitro and in vivo. *Clin Cancer Res* 2007;13(2 Pt 1):591-602.
140. Hartwell L. Defects in a cell cycle checkpoint may be responsible for the genomic instability of cancer cells. *Cell* 1992;71(4):543-546.
141. Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Science* 1994;266(5192):1821-1828.
142. Azorsa DO, Gonzales IM, Basu GD et al. Synthetic lethal RNAi screening identifies sensitizing targets for gemcitabine therapy in pancreatic cancer. *J Transl Med* 2009;7:43.
143. Dai Y, Grant S. New insights into checkpoint kinase 1 in the DNA damage response signaling network. *Clin Cancer Res* 2010;16(2):376-383.
144. Murakami K, Matsubara H, Hoshino I et al. CHAP31 induces apoptosis only via the intrinsic pathway in human esophageal cancer cells. *Oncology* 2010;78(1):62-74.

145. Taylor MD, Liu Y, Nagji AS, Theodosakis N, Jones DR. Combined proteasome and histone deacetylase inhibition attenuates epithelial-mesenchymal transition through E-cadherin in esophageal cancer cells. *J Thorac Cardiovasc Surg* 2010;139(5):1224-32, 1232.
146. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell* 1997;88(3):323-331.
147. Poehlmann A, Hahnel C, Walluscheck D et al. Cutting edge: Chk1 directs senescence and mitotic catastrophe in recovery from G(2) checkpoint arrest. *J Cell Mol Med* 2010.
148. Roninson IB, Broude EV, Chang BD. If not apoptosis, then what? Treatment-induced senescence and mitotic catastrophe in tumor cells. *Drug Resist Updat* 2001;4(5):303-313.
149. Marks PA, Dokmanovic M. Histone deacetylase inhibitors: discovery and development as anticancer agents. *Expert Opin Investig Drugs* 2005;14(12):1497-1511.
150. Hu Y, Benedict MA, Wu D, Inohara N, Nunez G. Bcl-XL interacts with Apaf-1 and inhibits Apaf-1-dependent caspase-9 activation 1. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1998;95(8):4386-4391.
151. Mitsiades N, Mitsiades CS, Richardson PG et al. Molecular sequelae of histone deacetylase inhibition in human malignant B cells. *Blood* 2003;101(10):4055-4062.
152. Zhang XD, Gillespie SK, Borrow JM, Hersey P. The histone deacetylase inhibitor suberic bishydroxamate regulates the expression of multiple apoptotic mediators and induces mitochondria-dependent apoptosis of melanoma cells. *Mol Cancer Ther* 2004;3(4):425-435.
153. Zhao Y, Tan J, Zhuang L, Jiang X, Liu ET, Yu Q. Inhibitors of histone deacetylases target the Rb-E2F1 pathway for apoptosis induction through activation of proapoptotic protein Bim. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2005;102(44):16090-16095.
154. Richon VM, Sandhoff TW, Rifkind RA, Marks PA. Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2000;97(18):10014-10019.
155. Ocker M, Schneider-Stock R. Histone deacetylase inhibitors: signalling towards p21cip1/waf1. *Int J Biochem Cell Biol* 2007;39(7-8):1367-1374.
156. Bornstein G, Bloom J, Sitry-Shevah D, Nakayama K, Pagano M, Hershko A. Role of the SCFSkp2 ubiquitin ligase in the degradation of p21Cip1 in S phase. *J Biol Chem* 2003;278(28):25752-25757.

157. Abbas T, Sivaprasad U, Terai K, Amador V, Pagano M, Dutta A. PCNA-dependent regulation of p21 ubiquitylation and degradation via the CRL4Cdt2 ubiquitin ligase complex. *Genes Dev* 2008;22(18):2496-2506.
158. Chen X, Chi Y, Bloecher A, Aebersold R, Clurman BE, Roberts JM. N-acetylation and ubiquitin-independent proteasomal degradation of p21(Cip1). *Mol Cell* 2004;16(5):839-847.
159. Cho SH, Toouli CD, Fujii GH, Crain C, Parry D. Chk1 is essential for tumor cell viability following activation of the replication checkpoint. *Cell Cycle* 2005;4(1):131-139.
160. Gali-Muhtasib H, Kuester D, Mawrin C et al. Thymoquinone triggers inactivation of the stress response pathway sensor CHEK1 and contributes to apoptosis in colorectal cancer cells. *Cancer Res* 2008;68(14):5609-5618.
161. Nomura M, Nomura N, Yamashita J. Geldanamycin-induced degradation of Chk1 is mediated by proteasome. *Biochem Biophys Res Commun* 2005;335(3):900-905.
162. Singh R, George J, Shukla Y. Role of senescence and mitotic catastrophe in cancer therapy. *Cell Div* 2010;5:4.
163. Waldman T, Kinzler KW, Vogelstein B. p21 is necessary for the p53-mediated G1 arrest in human cancer cells. *Cancer Res* 1995;55(22):5187-5190.
164. Boonstra JJ, van MR, Beer DG et al. Verification and unmasking of widely used human esophageal adenocarcinoma cell lines. *J Natl Cancer Inst* 2010;102(4):271-274.
165. Boonstra JJ, van der Velden AW, Beerens EC et al. Mistaken identity of widely used esophageal adenocarcinoma cell line TE-7. *Cancer Res* 2007;67(17):7996-8001.

## 7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1: Prozentualer Anteil ausgewählter Tumorlokalisationen an allen Krebserkrankungen ohne nicht-melanotischen Hautkrebs in Deutschland 2006. Aus [Hausmann et al, 2010] .....	2
Abb. 1.2: Prozentualer Anteil ausgewählter Tumorlokalisationen an allen Krebssterbefällen in Deutschland 2006. Aus [Hausmann et al, 2010] .....	2
Abb. 1.3: Chromatinstruktur in Abhängigkeit des Acetylierungsstatus. Mit zunehmender Modifikation der Chromatinstruktur kommt es zu einem fortschreitenden Verlust der Transkription. Dabei ist die Änderung durch Acetylierung reversibel. Aus [Gallinari et al, 2007]. .....	5
Abb. 1.4 Ansatzpunkte der Histondeacetylase-Inhibitoren. Zink-abhängige HDAC-Inhibitoren können in Tumorzellen Zellzyklusarrest und Zelltod über verschiedene Signalwege bewirken. Aus [Marks et al, 2009] .....	8
Abb. 1.5 Strukturformel von Panobinostat (LBH589) .....	13
Abb. 4.1 Konzentrationsabhängige Wirkung des HDACI LBH589 auf die Vitalität der Zelllinie TE-7 (A) und SEG-1 (B).....	38
Abb. 4.2 Effekt des HDACI LBH589 auf den Acetylierungsstatus der Histone H3 (A +B) und H4 (C + D) in den Zelllinien TE-7 (A + C) und SEG-1 (B + D).....	40
Abb. 4.3. Einfluss des HDACI LBH589 auf die p53-Proteinexpression der Zelllinien TE-7 (A) und SEG-1 (B).....	41
Abb. 4.4 Einfluss des HDACI LBH589 auf die p21 <sup>waf1</sup> -Proteinexpression der Zelllinien TE-7 (A) und SEG-1 (B). .....	41
Abb. 4.5 Einfluss des HDACI LBH589 auf den Chk1-Proteingehalt der Zelllinien TE-7 (A) und SEG-1 (B).....	42
Abb. 4.6 Einfluss des HDACI LBH589 auf den p-Chk1-Proteingehalt der Zelllinien TE-7 (A) und SEG-1 (B).....	43

Abb. 4.7 Einfluss des HDACI LBH589 auf die Aktivierung der Caspase 3 in den Zelllinien TE-7 (A) und SEG-1 (B). .....	44
Abb. 4.8 Konzentrationsabhängiger Effekt des Translationsinhibitors CHX auf die Zellletalität der Zelllinien TE-7 und SEG-1. ....	45
Abb. 4.9 Effekt des Translationsinhibitors CHX auf die Konzentration des Chk1-Proteins der Zelllinie TE-7 unter LBH589-Behandlung. ....	46
Abb. 4.10 Effekt des Translationsinhibitors CHX auf die Konzentration des Chk1-Proteins der Zelllinie SEG-1 unter LBH589-Behandlung. ....	47
Abb. 4.11 Konzentrationsabhängiger Effekt des Proteasominhibitors MG-132 auf die Zellletalität der Zelllinien TE-7 und SEG-1. ....	48
Abb. 4.12 Effekt des Proteasominhibitors MG-132 auf die Konzentration des Chk1-Proteins der Zelllinien TE-7 und SEG-1 unter LBH589-Behandlung nach 24h. ....	49
Abb. 4.13 Darstellung der Apoptoseraten der Zelllinie TE-7 unter LBH589-Behandlung (A +B). .....	51
Abb. 4.14 Darstellung der Apoptoseraten der Zelllinie SEG-1 unter LBH589-Behandlung (A +B). .....	53
Abb. 4.15 Einfluss des HDACI LBH589 auf die Aktivierung der Caspase 8 in den Zelllinien TE-7 (A) und SEG-1 (B). ....	54
Abb. 4.16 Einfluss des HDACI LBH589 auf die Aktivierung der Caspase 9 in den Zelllinien TE-7 (A) und SEG-1 (B). ....	55
Abb. 4.17 Einfluss des HDACI LBH589 auf den Bcl-2-Proteingehalt in den Zelllinien TE-7 (A) und SEG-1 (B). ....	56
Abb. 4.18 Einfluss des HDACI LBH589 auf den Bax-Proteingehalt in den Zelllinien TE-7 (A) und SEG-1 (B). ....	56

Abb. 4.19 Einfluss des HDACI LBH589 auf die Menge an $\gamma$ -H2AX in den Zelllinien TE-7 (A) und SEG-1 (B).....	58
Abb. 4.20 Zellzyklusanalyse der Zelllinie TE-7 unter LBH589-Behandlung (A, B)..	59
Abb. 4.21 Zellzyklusanalyse der Zelllinie SEG-1 unter LBH589-Behandlung (A, B)..	61
Abb. 4.22 Einfluss des HDACI LBH589 auf den Gehalt an p-H3 in den Zelllinien TE-7 (A) und SEG-1 (B)..	62
Abb. 4.23 Untersuchung der Chk1-Expression auf mRNA-Ebene der Zelllinien TE-7 und SEG-1 unter Einfluss von LBH589. ....	63
Abb. 4.24 Untersuchung der p21 <sup>waf1</sup> -Expression auf mRNA-Ebene der Zelllinien TE-7 und SEG-1 unter Einfluss von LBH589..	64
Abb. 5.1 Schema über die Signalkaskaden unter der Wirkung des HDACI LBH589 in der Zelllinie TE-7. ....	72
Abb. 5.2 Schema über die Signalkaskaden unter der Wirkung des HDACI LBH589 in der Zelllinie SEG-1. ....	73

## 8 Tabellenverzeichnis

Tab. 1: Zielproteine von HDAC (Auswahl) .....	6
Tab. 2: Effekt von Panobinostat auf die Vitalität von Krebszellen im Vergleich zu Vorinostat und MGCD0103. ....	12
Tab. 3: Zusammensetzung des Prämix für die Reverse Transkription .....	33
Tab. 4: Thermocycler-Programm für die Reverse Transkription.....	34
Tab. 5: Reaktionsansätze für die PCR im <i>LightCycler</i> ® .....	35
Tab. 6: <i>LightCycler</i> ®-Programm für Chk1 .....	35
Tab. 7: <i>LightCycler</i> ®-Programm für $\beta$ 2-MG .....	35
Tab. 8: <i>LightCycler</i> ®-Programm für p21.....	36
Tab. 9: Bax/Bcl-2 Ratio .....	57

## 9 Erklärung

Ich erkläre, dass ich die der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg zur Promotion eingereichte Dissertation mit dem Titel

„Proapoptotische und antiproliferative Wirkung des Histondeacetylase-Inhibitors LBH589 in Abhängigkeit vom p53- und Chk1-Status“

im Institut für Pathologie, mit Unterstützung durch Prof. Dr. rer. nat. Regine Schneider-Stock ohne sonstige Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung der Dissertation keine anderen als die dort aufgeführten Hilfsmittel benutzt habe.

Bei der Abfassung der Dissertation sind Rechte Dritter nicht verletzt worden.

Ich habe diese Dissertation bisher an keiner in- oder ausländischen Hochschule zur Promotion eingereicht. Ich übertrage der Medizinischen Fakultät das Recht, weitere Kopien meiner Dissertation herzustellen und zu vertreiben.

Berlin, den 12. Oktober 2011

Johanna Pech

## **10 Danksagung**

Zunächst danke ich Herrn Prof. Dr. med. A. Roessner, Direktor des Instituts für Pathologie der Medizinischen Fakultät der Otto-von-Guericke Universität Magdeburg, für die Möglichkeit, diese Arbeit an seinem Institut anfertigen zu können.

Mein besonderer Dank gilt vor allem meiner Doktormutter, Prof. Dr. rer. nat. Regine Schneider-Stock für die Vergabe dieses interessanten Themas und die vielfältige Unterstützung, ohne die diese Arbeit nicht zustande gekommen wäre.

Ich danke Fr. Staeck für die Einführung in die Geheimnisse der Zellkultur sowie Fr. Schönborn, Fr. Schindlauer und Fr. Scharfenort, für die freundliche Aufnahme in die Arbeitsgruppe, die Unterstützung und Zuarbeit.

Des Weiteren möchte ich mich auch bei Diana Walluscheck für die gute Einarbeitung bedanken. Mein Dank gilt außerdem den Biologie-Doktorandinnen Anne Teller, Kathrin Reißig, Jelena Ivanovska, Saritha Chakilam und Svantje Tauber für ihren wissenschaftlichen Rat und für ihre moralische Unterstützung. Anne und Kathrin, Danke für eure Freundschaft.

Ohne meine Eltern wäre dies alles nicht möglich gewesen. Dank ihrer Unterstützung und Fürsorge habe ich alle meine Ziele erreichen können. Ich danke euch von Herzen für eure Liebe und euer Vertrauen.

Mein Freund Sebastian Kuss war besonders in der Schlussphase dieser Arbeit eine wertvolle Unterstützung.

## 1.1 Lebenslauf

### Persönliche Angaben

Name	Johanna Pech
Anschrift	Gierkezeile 26 10585 Berlin
Email	johanna.pech@gmx.de
Geburtsdatum und -ort	12.02.1984 in Berlin

### Schulische Ausbildung

1990 – 1996	Grundschule am Königsgraben in Berlin/Steglitz
1996 – 2003	Beethoven-Gymnasium in Berlin/Steglitz

### Universitäre Ausbildung

10/2003 - 03/2006	Vorklinischer Studienabschnitt Humanmedizin Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
03/2006	Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung
10/2006 - 10/2010	Klinischer Studienabschnitt Humanmedizin Otto-von-Guericke-Universität Magdeburg
10/2010	Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung Gesamtnote: „ <i>sehr gut</i> “

### Berufliche Tätigkeit

Seit 03/2011	Assistenzärztin in der Klinik für Gynäkologie und Geburtshilfe am DRK Klinikum Westend, Berlin
--------------	---