

DER EINFLUSS VON α – LIPONSÄURE UND
WEITEREN HDAC-INHIBITOREN AUF
TUMORWACHSTUM UND ANGIOGENESE IN DER
PANKREASKARZINOMZELLINIE MIA-PaCa-2

BIANCA AUER

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie
der Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. R. Gerstberger
und
dem Zentrum der Inneren Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
Frankfurt am Main
Betreuer: Prof. Dr. Dr. J. Stein

DER EINFLUSS VON α – LIPONSÄURE UND
WEITEREN HDAC-INHIBITOREN AUF
TUMORWACHSTUM UND ANGIOGENESE IN DER
PANKREASKARZINOMZELLINIE MIA-PaCa-2

INAUGURAL-DISSERTATION
zur Erlangung des Grades eines
Dr. med. vet.
beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von
BIANCA AUER
Tierärztin aus Erlenbach am Main

Gießen 2008

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Dekan: Prof. Dr. Dr. habil. G. Baljer

Gutachter: Prof. Dr. R. Gerstberger
Prof. Dr. Dr. J. Stein

Tag der Disputation: 23. Juni 2008

Für meine Eltern

und

Richard Kehrer

DANKSAGUNG

Die vorliegende Arbeit entstand in den Jahren 2003-2008 in der Medizinischen Klinik II des Universitätsklinikums Frankfurt am Main.

Mein herzlichster Dank gilt zuallererst Herrn Prof. Dr. Dr. Jürgen Stein für die Überlassung des interessanten Themas und die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe. Herr Prof. Dr. Dr. Stein schaffte die Voraussetzungen für das Gelingen dieser Dissertation und stand mir während der Entstehung mit seiner fachlichen Beratung stets hilfreich zur Seite. Mit seinem unermüdlichen Interesse am Fortgang meines Promotionsvorhabens konnte er mich immer wieder motivieren. Ich danke ihm auch sehr für seine freundliche Unterstützung und die hilfreichen Anregungen bei den Korrekturen meiner Arbeit.

Ganz besonders möchte ich mich an dieser Stelle auch bei Herrn Prof. Dr. Rüdiger Gerstberger für sein Interesse an meiner Dissertation und die Vertretung im Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Giessen bedanken.

Von unschätzbarem Wert für die Einarbeitung in die Methoden der Zellkulturtechnik, für die Durchführung der Experimente sowie die Diskussion meiner Ergebnisse waren für mich die Unterstützung und Zusammenarbeit mit Sandra Ulrich und Carolin Daniel im Gastroenterologischen Labor. Herzlichsten Dank für eure unermüdliche Hilfsbereitschaft, eure Geduld und eure Zeit sowie die schönen Stunden auch außerhalb des Labors.

Vielen Dank an Nadine für die unersetzliche Hilfestellung bei der Durchführung der Versuche und der Arbeit mit den Laborgeräten.

Ganz herzlichen Dank auch an Ute, die mir während der Erstellung dieser Arbeit jederzeit mit Rat und Tat zur Seite stand.

Für ihre freundliche Aufnahme, ihre Hilfe und das angenehme Arbeitsklima danke ich auch allen anderen Mitarbeitern der Arbeitsgruppe Stein.

Nicht zuletzt möchte ich **meinen Eltern Renate und Alexander Kehrer** von Herzen danken, dass sie mir mein Studium und die Erstellung dieser Dissertation ermöglicht und immer an mich geglaubt haben. Danke für eure wertvolle und uneingeschränkte Unterstützung und Motivation „in guten wie in schlechten Zeiten“.

Diese Arbeit wurde aus Mitteln der Else Kröner-Fresenius-Stiftung unterstützt.

Frankfurt am Main, 2008

ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS

α	alpha
Abb.	Abbildung
AEDs	anti-epileptic drugs
AKT	Serin/Threonin Kinase, Proteinkinase B
Ang1	Angiopietin-1
APS	Ammoniumperoxidsulfat
Aqua ad inj.	Aqua ad injectabilia
Aqua bidest.	Aqua bidestillata
β	beta
bFGF	basic fibroblast growth factor
BMP2	bone morphogenetic protein 2
BrdU	5-bromo-2`deoxyuridine
But	Butyrat
bzw.	beziehungsweise
Caco-2	Kolonadenokarzinomzellen
CDI	cartilage-derived inhibitor
cdk	cyclin dependent kinase
CO ₂	Kohlendioxid
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DTT	1,4-Dithio-L-Threitol
ECACC	European Collection of Cell Cultures
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat
EGF	epidermal growth factor
ELISA	Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA)
ERK	extrazellulär regulierte Kinase
et al.	et alii
FCS	Foetales Kälberserum
FGF	fibroblast growth factor
G-CSF	granulocyte colony-stimulating factor
GLA-LA	gamma linolenic acid-lipoic acid
H	Histon
HAT	Histonacetyltransferase

Abkürzungsverzeichnis

hCG	human chorionic gonadotropin
HDAC	Histondeacetylase
HDI	Histondeacetylaseinhibitor
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin)-Ethansulfonsäure
HGF	hepatocyte growth factor
HIF-1 α	hypoxia inducible factor-1 α
HNSCC	head and neck squamous carcinoma cells
HRE	hypoxia response element
HRP	horse radish peroxidase, Meerrettichperoxidase
HUVEC	human umbilical vein endothelial cell
IGF-1	insulin-like Growth Factor 1
IgG	Immunglobulin G
IL	Interleukin
IP	interferon inducible protein
JNK	c-Jun NH ₂ -terminale Kinase
K	Kontrolle
Kap.	Kapitel
kD	kiloDalton
KGF	keratinocyte growth factor
LDH	Lactatdehydrogenase
LS	Liponsäure
LPS	Lipopolysaccharid
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MEK	MAPK upstream aktivierende Kinase
mM	milliMolar
MMP	Matrixmetalloproteinase
mRNA	messenger-Ribonukleinsäure
MV	mean value
n	Anzahl an Experimenten
NF- κ B	nuclear factor kappa B
NGF	nerve growth factor
nM	nanomolar
NPY	Neuropeptid Y
p	Signifikanz
PaCa	Pankreaskarzinomzellen
PC	Pankreaskarzinom
PF	platelet factor

Abkürzungsverzeichnis

PBS	Phosphat-gepufferte isotonische NaCl-Lösung
PCR	polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion
PDGF	platelet-derived growth factor
PI3K	PI3-Kinase, Phosphatidylinositol 3-Kinase
PD-ECGF	platelet-derived endothelial cell growth factor
PDGF-BB	platelet-derived growth factor-BB
PIGF	placental growth factor
pp38	phospho-p38
PPAR γ	peroxisome proliferator activated receptor γ
PTN	Pleiotrophin
vHL	von Hippel-Lindau Tumorsuppressorprotein
RNA	Ribonukleinsäure
RT	Reverse Transkription
RXR	VDR-retinoid X-Rezeptor
SAHA	suberoylanilide hydroxamic acid
SAPK	Stress-aktivierte Proteinkinase
SB203580	spezifischer p38-Inhibitor
SDS	Dodecylsulfat, Natriumsalz
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat- Polyacrylamid-Gelelektrophorese
S.E.	standard error
SEM	standard error of the mean
SF	scatter factor
SP	Substanz P
Tab.	Tabelle
TBS	Tris-gepufferte isotonische NaCl-Lösung
TBS-T	Tris-gepufferte isotonische NaCl-Lösung plus Tween-20
TEMED	Tetra-N-methyl-ethylendiamin
TGF	transforming growth factor
TGF- α	transforming growth factor- α
TGF- β	transforming growth factor- β
TNF	tumor necrosis factor
TNF- α	tumor necrosis factor- α
TNM	T : Primärtumor, N : Lymphknotenbeteiligung, M : Metastasen
TSA	Trichostatin A
TSP	Thrombospondin
UICC	Union International Contre Cancer

Abkürzungsverzeichnis

VEGF	vascular endothelial growth factor
VPA	Valproat, Valproinsäure
VDR	Vitamin D Rezeptor
VPF	vascular permeability factor
vs	versus
z.B.	zum Beispiel

ABBILDUNGSVERZEICHNIS

Abbildung 1.1	Struktur eines Nukleosoms	6
Abbildung 1.2	Reversible Histonacetylierung	7
Abbildung 1.3	Strukturformel von α -Liponsäure	13
Abbildung 1.4	Intrazelluläre Reduktion von α -Liponsäure zu Dihydroliponsäure	14
Abbildung 1.5	Strukturformel von Butyrat	17
Abbildung 1.6	Strukturformel von Valproinsäure	20
Abbildung 1.7	Strukturformel von Trichostatin A	23
Abbildung 1.8	Angiogenic Switch	27
Abbildung 1.9	Zellulärer Mechanismus der Tumorangio-genese	30
Abbildung 1.10	Regulation von VEGF durch HIF-1 α	34
Abbildung 2.1	Mikroskopische Aufnahme eines subkonfluenten MIA-PaCa-2 Monolayers	44
Abbildung 3.1	Zytotoxizitätstest für α -Liponsäure (1-10mM/L)	59
Abbildung 3.2a	Zellzahl von MIA-PaCa-2 nach 24-stündiger Inkubation mit Butyrat (1 und 2mM/L), Valproat (1 und 2mM/L), Trichostatin A (100 und 400nM/L), α -Liponsäure (1, 2 und 5mM/L)	60
Abbildung 3.2b	Zellzahl von MIA-PaCa-2 nach 24-stündiger Inkubation mit Butyrat (1 und 2mM/L), Valproat (1 und 2mM/L), Trichostatin A (100 und 400nM/L), α -Liponsäure (1, 2 und 5mM/L)	61

Abbildung 3.3a	Zellproliferation von MIA-PaCa-2 nach 24-stündiger Inkubation mit Buyrat (1 und 2mM/L), Valproat (1 und 2mM/L), Trichostatin A (100 und 400nM/L), α -Liponsäure (1, 2 und 5mM/L)	62
Abbildung 3.3b	Zellproliferation von MIA-PaCa-2 nach 48-stündiger Inkubation mit Buyrat (1 und 2mM/L), Valproat (1 und 2mM/L), Trichostatin A (100 und 400nM/L), α -Liponsäure (1, 2 und 5mM/L)	63
Abbildung 3.4a	VEGF Konzentration im Zellkulturüberstand von MIA-PaCa-2 Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Buyrat (1 und 2mM/L), Valproat (1 und 2mM/L), Trichostatin A (100 und 400nM/L), α -Liponsäure (1, 2 und 5mM/L)	65
Abbildung 3.4b	VEGF Konzentration im Zellkulturüberstand von MIA-PaCa-2 Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit Buyrat (1 und 2mM/L), Valproat (1 und 2mM/L), Trichostatin A (100 und 400nM/L), α -Liponsäure (1, 2 und 5mM/L)	66
Abbildung 3.4c	Western Blot des VEGF Proteins in der zytoplasmatischen Fraktion der MIA-PaCa-2 Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit α -Liponsäure (1, 2 und 5mM/L)	67
Abbildung 3.4d	Quantifizierung des VEGF Proteins in der zytoplasmatischen Fraktion der MIA-PaCa-2 Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit α -Liponsäure (1, 2 und 5mM/L)	68
Abbildung 3.4e	Western Blot des VEGF Proteins in der zytoplasmatischen Fraktion der MIA-PaCa-2 Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit Butyrat (1 und 2mM/L)	69
Abbildung 3.4f	Quantifizierung des VEGF Proteins in der zytoplasmatischen Fraktion der MIA-PaCa-2 Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit Butyrat (1 und 2mM/L)	69

Abbildung 3.5a	Western Blot des HIF-1 α Proteins in der zytoplasmatischen Fraktion der MIA-PaCa-2 Zellen nach 12-stündiger Inkubation mit α -Liponsäure (1, 2 und 5mM/L)	71
Abbildung 3.5b	Quantifizierung des HIF-1 α Proteins in der zytoplasmatischen Fraktion der MIA-PaCa-2 Zellen nach 12-stündiger Inkubation mit α -Liponsäure (1, 2 und 5mM/L)	71
Abbildung 3.5c	Western Blot des HIF-1 α Proteins in der zytoplasmatischen Fraktion der MIA-PaCa-2 Zellen nach 12-stündiger Inkubation mit Butyrat (1 und 2mM/L)	73
Abbildung 3.5d	Quantifizierung des HIF-1 α Proteins in der zytoplasmatischen Fraktion der MIA-PaCa-2 Zellen nach 12-stündiger Inkubation mit Butyrat (1 und 2mM/L)	73
Abbildung 3.6a	Western Blot des VDR Proteins in der nukleären Fraktion der MIA-PaCa-2 Zellen nach 12-stündiger Inkubation mit α -Liponsäure (1, 2 und 5mM/L)	75
Abbildung 3.6b	Quantifizierung des VDR Proteins in der nukleären Fraktion der MIA-PaCa-2 Zellen nach 12-stündiger Inkubation mit α -Liponsäure (1, 2 und 5mM/L)	75
Abbildung 3.6c	Western Blot des VDR Proteins in der nukleären Fraktion der MIA-PaCa-2 Zellen nach 12-stündiger Inkubation mit Butyrat (1 und 2mM/L)	77
Abbildung 3.6d	Quantifizierung des VDR Proteins in der nukleären Fraktion der MIA-PaCa-2 Zellen nach 12-stündiger Inkubation mit Butyrat (1 und 2mM/L)	77
Abbildung 3.6e	Western Blot des VDR Proteins in der nukleären Fraktion der MIA-PaCa-2 Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Butyrat (1 und 2mM/L)	78

Abbildung 3.6f	Quantifizierung des VDR Proteins in der nukleären Fraktion der MIA-PaCa-2 Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Butyrat (1 und 2mM/L)	78
Abbildung 3.7a	Western Blot des p38 Proteins im Gesamthomogenat der MIA-PaCa-2 Zellen nach 12-stündiger Inkubation mit α -Liponsäure (1mM/L) und dem p38-Inhibitor SB203580	80
Abbildung 3.7b	Quantifizierung des p38 Proteins im Gesamthomogenat der MIA-PaCa-2 Zellen nach 12-stündiger Inkubation mit α -Liponsäure (1mM/L) und dem p38-Inhibitor SB203580	80
Abbildung 3.7c	Western Blot des p38 Proteins im Gesamthomogenat der MIA-PaCa-2 Zellen nach 12-stündiger Inkubation mit Butyrat (1und 2mM/L) und dem p38-Inhibitor SB203580	81
Abbildung 3.7d	Quantifizierung des p38 Proteins im Gesamthomogenat der MIA-PaCa-2 Zellen nach 12-stündiger Inkubation mit Butyrat (1und 2mM/L) und dem p38-Inhibitor SB203580	81
Abbildung 3.7e	Western Blot des pp38 Proteins im Gesamthomogenat der MIA-PaCa-2 Zellen nach 12-stündiger Inkubation mit α -Liponsäure (1mM/L) und dem p38-Inhibitor SB203580	83
Abbildung 3.7f	Quantifizierung des pp38 Proteins im Gesamthomogenat der MIA-PaCa-2 Zellen nach 12-stündiger Inkubation mit α -Liponsäure (1mM/L) und dem p38-Inhibitor SB203580	83
Abbildung 3.7g	Western Blot des pp38 Proteins im Gesamthomogenat der MIA-PaCa-2 Zellen nach 12-stündiger Inkubation mit Butyrat (1und 2mM/L) und dem p38-Inhibitor SB203580	84
Abbildung 3.7h	Quantifizierung des pp38 Proteins im Gesamthomogenat der MIA-PaCa-2 Zellen nach 12-stündiger Inkubation mit Butyrat (1 und 2mM/L) und dem p38-Inhibitor SB203580	84

Abbildung 3.7i	Western Blot des pp38 Proteins im Gesamthomogenat der MIA-PaCa-2 Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Butyrat (1 und 2mM/L) und dem p38-Inhibitor SB203580	86
Abbildung 3.7j	Quantifizierung des pp38 Proteins im Gesamthomogenat der MIA-PaCa-2 Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Butyrat (1 und 2mM/L) und dem p38-Inhibitor SB203580	86
Abbildung 3.8a	Western Blot des VEGF Proteins im Gesamthomogenat der MIA-PaCa-2 Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit α -Liponsäure (1mM/L) und dem p38-Inhibitor SB203580	89
Abbildung 3.8b	Quantifizierung des VEGF Proteins im Gesamthomogenat der MIA-PaCa-2 Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit α -Liponsäure (1mM/L) und dem p38-Inhibitor SB203580	89
Abbildung 3.8c	Western Blot des VEGF Proteins im Gesamthomogenat der MIA-PaCa-2 Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit Butyrat (1 und 2mM/L) und dem p38-Inhibitor SB203580	90
Abbildung 3.8d	Quantifizierung des VEGF Proteins im Gesamthomogenat der MIA-PaCa-2 Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit Butyrat (1 und 2mM/L) und dem p38-Inhibitor SB203580	90

TABELLENVERZEICHNIS

Tabelle 1.1	Verschiedene HDAC-Klassen	8
Tabelle 1.2	Pro- und antiangiogenetische Faktoren	28

INHALTSVERZEICHNIS

DANKSAGUNG	I
ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	III
ABBILDUNGSVERZEICHNIS	VII
TABELLENVERZEICHNIS	XII
INHALTSVERZEICHNIS	XIII

1	EINLEITUNG	
1.1	Das Pankreaskarzinom	1
1.1.1	Epidemiologie	1
1.1.2	Ätiologie	1
1.1.3	Pathomorphologische Einteilung des Pankreaskarzinoms	2
1.1.4	Klinik, Prognose, Therapie	3
1.2	Histondeacetylaseinhibitoren	5
1.2.1	HATs und HDACs	5
1.2.2	HDAC-Klassen	7
1.2.3	Bedeutung von HDACs für die Pathogenese maligner Erkrankungen	9
1.2.4	HDAC-Inhibition	10
1.2.4.1	Der HDAC-Inhibitor α -Liponsäure	13
1.2.4.2	Der HDAC-Inhibitor Butyrat	17
1.2.4.3	Der HDAC-Inhibitor Valproat	20
1.2.4.4	Der HDAC-Inhibitor Trichostatin A	23
1.3	Hemmung der tumorinduzierten Angiogenese	25
1.3.1	Der physiologische Angiogeneseprozess	25
1.3.2	Angiogenese bei nicht-neoplastischen Erkrankungen	25
1.3.3	Angiogenese und Tumorentstehung	26
1.3.3.1	Der <i>Angiogenic Switch</i>	26
1.3.3.2	Die tumorinduzierte Angiogenese	29
1.3.3.3	Tumorgefäßformation	30
1.3.4	Die Wachstumsfaktoren VEGF und FGF	32
1.3.5	Der Transkriptionsfaktor HIF-1 α	32
1.3.6	Der Vitamin D Rezeptor	35
1.3.5	Mitogen-aktivierte Proteinkinasen	36
1.4	Ziel der Arbeit	38

2	MATERIAL UND METHODEN	
2.1	Chemikalien und Lösungen	39
2.1.1	Allgemeine Chemikalien und Lösungen	39
2.1.2	Immunchemische Materialien	41
2.1.2.1	Antikörper	41
2.1.2.1.1	Erstantikörper	41
2.1.2.1.2	Zweitantikörper	41
2.1.2.2	Inhibitoren	42
2.1.3	Kit-Systeme	42
2.2	Arbeitsmaterialien und Geräte	42
2.2.1	Arbeitsmaterialien	42
2.2.2	Geräte	43
2.3	Die Zelllinie MIA-PaCa-2	44
2.4	Zellkulturtechnik	45
2.4.1	Kultivierung der Zellen	45
2.4.2	Passagieren der Zellen	45
2.5	Zytotoxizitätstest	46
2.6	Zellzahlbestimmung mittels Kristallviolett	47
2.7	Bestimmung der Zellproliferation mittels BrdU-Test	48
2.8	Gewinnung von Zellkulturüberständen	48
2.9	ELISA – Enzyme-linked Immunosorbent Assay	49
2.10	Proteingewinnung	50
2.10.1	Gewinnung zellulärer Proteine	50
2.10.2	Gewinnung nukleärer Proteine	51
2.10.3	Gewinnung von Whole-Cell Extract	51
2.11	Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford	52
2.12	Western Blot – Immunologischer Nachweis von Proteinen	53
2.12.1	SDS-Gelelektrophorese	53
2.12.2	Proteintransfer auf Nitrozellulose	54
2.12.3	Immunchemische Detektion mittels Chemilumineszenz	55
2.1.3	Statistische Auswertung	57

3	ERGEBNISSE	
3.1	Zytotoxizität von α -Liponsäure	58
3.2	Zellzahl von MIA-PaCa-2	59
3.3	Zellproliferation von MIA-PaCa-2	62
3.4	Einfluss von HDAC-Inhibitoren auf die Synthese von VEGF in MIA-PaCa-2 Zellen	64
3.4.1	Sekretion von VEGF	64
3.4.2	Proteinexpression von VEGF nach Behandlung mit α -Liponsäure und Butyrat	67
3.4.2.1	VEGF-Expression 48 h nach Behandlung mit α -Liponsäure	67
3.4.2.2	VEGF-Expression 48 h nach Behandlung mit Butyrat	69
3.5	Einfluss von α -Liponsäure und Butyrat auf den Angiogenese relevanten Faktor HIF-1 α	70
3.5.1	Proteinexpression von HIF-1 α nach Behandlung mit α -Liponsäure	71
3.5.2	Proteinexpression von HIF-1 α nach Behandlung mit Butyrat	72
3.6	Einfluss von α -Liponsäure im Vergleich zu Butyrat auf die VDR-Expression in MIA-PaCa-2 Zellen	74
3.6.1	VDR-Expression in MIA-PaCa-2 Zellen 12h nach Behandlung mit α -Liponsäure	75
3.6.2	VDR-Expression in MIA-PaCa-2 Zellen 12h und 24h nach Behandlung mit Butyrat	76
3.6.2.1	VDR-Expression nach 12h	76
3.6.2.2	VDR-Expression nach 24h	78
3.7	Einfluss von α -Liponsäure und Butyrat auf die p38- und pp38-Expression in MIA-PaCa-2 Zellen unter Verwendung des p38-Inhibitors SB 203580	79
3.7.1	p38-Expression in MIA-PaCa-2 Zellen nach Behandlung mit α -Liponsäure bzw. Butyrat und SB 203580	80
3.7.1.1	Behandlung mit α -Liponsäure und SB 203580	80
3.7.1.2	Behandlung mit Butyrat und SB 203580	81
3.7.2	pp38-Expression in MIA-PaCa-2 Zellen nach Behandlung mit α -Liponsäure bzw. Butyrat und SB 203580	82
3.7.2.1	Behandlung mit α -Liponsäure und SB 203580	82
3.7.2.2	Behandlung mit Butyrat und SB 203580	84
3.8	Einfluss von α -Liponsäure und Butyrat auf die VEGF-Expression in MIA-PaCa-2 Zellen unter Einsatz des p38-Inhibitors SB 203580	88
3.8.1	VEGF-Expression in MIA-PaCa-2 Zellen 48 h nach Behandlung mit α -Liponsäure und SB 203580	88
3.8.2	VEGF-Expression in MIA-PaCa-2 Zellen 48 h nach Behandlung mit Butyrat und SB203580	90

4	DISKUSSION	
4.1	HDI – Wirkung auf Zellzahl und Proliferation von MIA-PaCa-2	92
4.2	Funktion von VEGF	93
4.3	HIF-1 α und HDAC-Inhibitoren	95
4.4	Mögliche Wirkmechanismen der HDAC-Hemmung	97
4.4.1	VDR-Expression	97
4.4.2	p38- und pp38-Expression	100
4.5	p38-MAPK-Signalweg und Angiogenese	103
5	ZUSAMMENFASSUNG	104
6	SUMMARY	106
7	LITERATURVERZEICHNIS	108

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

1 EINLEITUNG

1.1 Das Pankreaskarzinom

1.1.1 Epidemiologie

Das Pankreaskarzinom (PC), ein epithelialer maligner Tumor der Bauchspeicheldrüse, gilt nach dem Kolon- und Magenkarzinom als dritthäufigster Tumor des Verdauungstraktes.

Laut Cancer Statistics der American Cancer Society vom 28. April 2008 werden für Ende des Jahres 2008 37.680 neue Erkrankungen und 34.290 Todesfälle in den USA erwartet, davon 18.770 Neuerkrankungen bei Männern und 18.910 bei Frauen [1]. In Deutschland wird die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen bei Männern auf etwa 6.000, bei Frauen auf etwa 6.600 geschätzt. Pankreaskarzinome sind in Deutschland für 6,1 % aller Krebstodesfälle verantwortlich und sind die vierthäufigste Krebstodesursache bei Frauen und die fünfhäufigste bei Männern. Laut Deutschem Krebsregister 2006 liegt das mittlere Erkrankungsalter für Männer bei über 68, für Frauen bei etwa 76 Jahren [2]. In den USA steht das PC sowohl bei Männern als auch bei Frauen mit 6% an 4. Stelle der Krebstodesursachen [1]. Da es meist erst sehr spät entdeckt und auch behandelt wird besteht nach wie vor kaum eine Aussicht auf Heilung [2]. Trotz des enormen wissenschaftlichen Fortschritts hat sich die Überlebensrate in den letzten 20 Jahren nicht verbessert und die Kenntnis um Entstehung, Fortschreiten, Metastasierung und Therapie des PC bleibt unvollständig [3].

1.1.2 Ätiologie

Die Entstehungsursache der Erkrankung ist noch weitgehend unbekannt. Neben der chronischen Pankreatitis, der hereditären Pankreatitis und dem Diabetes mellitus ist ein Faktor, der das Risiko an Bauchspeicheldrüsenkrebs zu erkranken bekannterweise erhöht, das Rauchen von Zigaretten. Selten tritt das vererbare, sogenannte familiäre Pankreaskarzinom auf. Basierend auf den Erhebungen eines Forschungsprojekts der Deutschen Krebshilfe beruhen drei bis fünf Prozent der Pankreaskarzinome auf einer vererbten genetischen Veranlagung und treten familiär gehäuft auf [4].

Laut Deutschem Ärzteblatt 2002 geben familiär gehäufte Pankreaskarzinome, das Pleutz-Jeghers-Syndrom, das „familiäre atypische multiple Muttermal- und Melanom-Syndrom“ sowie das hereditäre Mamma- und Ovarialkarzinom Anlass, auf ein Pankreaskarzinom hin zu überwachen [5]. Für diese Prädispositionen stehen in naher Zukunft wohl genetische Screening-Methoden (zB. CDKN2A-, BRCA2- oder PRSS1-Mutation) zur Verfügung [6].

Andere mögliche Faktoren wie übermäßiger Alkoholabusus, eiweiss- und/oder kohlenhydratreiche Ernährung und andauernder Kontakt mit verschiedenen chemischen Substanzen, wie beispielsweise Naphtylamin oder Benzidin, werden diskutiert [4].

1.1.3 Pathomorphologische Einteilung des PC

Anhand der Histomorphologie unterteilt man in drei Karzinomtypen:

1. Karzinome, die vom Pankreasgangepithel ausgehen

Zu dieser Gruppe zählen die tubulären Adenokarzinome, die etwa 85% aller PCs ausmachen, zu 5-9% findet man pleomorphe duktale Karzinome und zu 1-3% duktale zystische Adenome/Adenokarzinome.

2. Karzinome, die vom Pankreasazinusepithel ausgehen

Azinäre Karzinome treten zu weniger als 1% auf.

3. Karzinome mit unklarer Histogenese

In 1-3% treten papillär-zystische Karzinome, Pankreatoblastome und kleinzellige pleomorphe Karzinome auf.

Laut der Interdisziplinären Leitlinie für das PC des Tumorzentrums Berlin können alle Pankreaskarzinome zusammen mit einer chronisch-fibrosierenden Entzündung auftreten, die die Einteilung und Abgrenzung der hochdifferenzierten, dukталen Karzinome deutlich erschweren [4].

Klinische Einteilung (TNM-Klassifikation) und Staging erfolgen nach UICC (Union International Contre Cancer). Hierbei unterscheidet man anhand des entsprechenden TNM-Status sechs Stadien, die eine Aussage darüber geben, inwieweit sich der Tumor von der Bauchspeicheldrüse ausgehend auf andere Bereiche des Körpers ausgebreitet hat [4,7].

T beschreibt hierbei den Primärtumor und dessen Ausbreitung auf benachbarte Gewebe. N steht für die Mitbeteiligung regionaler Lymphknoten und M für Fernmetastasen.

1.1.4 Klinik, Prognose und Therapie

Die Bauchspeicheldrüse ist ungefähr 15 cm lang, liegt quer im Oberbauch in einer Schleife, die durch einen Teil des Dünndarms (Duodenum) geformt wird. Das Pankreas ist am einen Ende breiter und zum anderen Ende hin schmaler werdend. Das rechte breitere Ende wird als Kopf bezeichnet, das mittlere als Körper und das linke schmalere Ende als Pankreasschwanz. Mit ihrem Kopf schmiegt sich die Bauchspeicheldrüse an den Dünndarm, ihr Körper befindet sich vor den grossen Hohlvenen und mit ihrem Schwanz liegt sie der Milz an [8]. Die Lokalisation der Pankreaskarzinome findet sich zu 70% im Bereich des Pankreaskopfes, zu 20% am Körper der Bauchspeicheldrüse und zu 10% im Pankreasschwanzbereich [6].

Die Bauchspeicheldrüse hat zwei grundlegende Aufgaben im Körper: Sie produziert Verdauungssäfte und Hormone. Das exokrine Pankreas ist der Teil, der die Verdauungsenzyme produziert, die über einen Ausführungsgang in das Duodenum gelangen und dafür sorgen, dass Fette, Eiweiße und Kohlenhydrate der Nahrung im Darm in ihre Grundbestandteile gespalten und in eine von der Darmschleimhaut aufnehmbare Größe zerkleinert werden. Im exokrinen Pankreas entstehen etwa 95% der Pankreaskarzinome. Der hormonproduzierende Teil der Bauchspeicheldrüse wird endokrines Pankreas genannt. Dieser endokrine Anteil des Pankreas sind die Langerhansschen Inseln, die vor allem für die Regulation des Blutzuckerspiegels (über die Hormone Insulin und Glucagon) sowie von Verdauungsprozessen verantwortlich sind. Ca. 5% der Karzinome beginnen im Bereich des endokrinen Pankreas [8].

Bösartige Neubildungen der Bauchspeicheldrüse gehören zu den Krebserkrankungen, deren Frühsymptome selten und uncharakteristisch sind. Die Diagnose erfolgt fast immer in einem späten und fortgeschrittenen Stadium, was eine ausgesprochen schlechte Prognose mit sich bringt. Die relative 5-Jahresüberlebensrate liegt für Männer bei 5 % und für Frauen bei 4 %. Von den 10% derjenigen Patienten mit resezierbarem PC überlebt nur einer von fünf Patienten die nachfolgenden fünf Jahre [3,9].

Je nach Stadium der Tumorprogression kann eine chirurgische Entfernung des Tumors möglich sein. Hierbei unterscheidet man die Operation nach Whipple, die totale Pankreatektomie und die distale Pankreatektomie:

Bei der Operationsmethode nach Whipple wird der Kopf des Pankreas, Teile des Dünndarms und Gewebe aus der Umgebung des Tumors reseziert. Es verbleibt genügend Pankreasgewebe im Körper um die Produktion von Verdauungssäften und z.B. Insulin sicher zu stellen. Die totale Pankreatektomie bedeutet die Entfernung der gesamten Bauchspeicheldrüse, Teilen von Dünndarm und Magen, des Gallengangs, der Gallenblase, der Milz und den meisten

regionären Lymphknoten. Bei der distalen Pankreatektomie werden Pankreaskörper und –schwanz entfernt [8]. Gelingt eine Resektion, so liegt die mittlere Lebenserwartung bei 1 bis 1 ½ Jahren und die 5-Jahresüberlebensrate unter 20% [6]. Nur 15-20% aller Patienten kommen für eine Operation in Frage, wobei die operative Entfernung lokalisierter Tumore die einzige Hoffnung auf Heilung des Pankreaskarzinoms darstellt [9].

Eine palliative Operation kann bei Magenausgangs- oder Duodenalstenosen durchgeführt werden. Wenn der Tumor die Speisepassage vom Magen aus blockiert, kann der Magen direkt an das Duodenum genäht werden, so dass der Patient weiterhin normal essen kann.

Bei Kompression des Dünndarms durch den Tumor und Zurückstauen von Gallenflüssigkeit bis in die Gallenblase kann ein sogenannter Gallengangs-Bypass gelegt werden [8].

Hierbei wird ein Katheter oder Stent endoskopisch oder chirurgisch eingesetzt, der angestaute Gallenflüssigkeit ableitet. Dieser umgeht entweder den verengten Bereich und leitet die Flüssigkeit in den Dünndarm oder ein Katheter leitet sie aus dem Körper heraus.

Weiterhin wird die Strahlentherapie als alleinige Therapie oder in Kombination mit einem chirurgischen Eingriff zur Behandlung des Pankreaskarzinoms eingesetzt. In beiden Fällen gilt sie als nicht erfolgsversprechend [6]. Es wird hochenergetische Röntgenstrahlung zum Abtöten der Tumorzellen und zur Verkleinerung des Karzinoms abgegeben. Man unterscheidet die externe Strahlentherapie von der inneren Bestrahlungstherapie, bei der Radioisotope (radioaktiv strahlendes Material) in den betroffenen Bereich eingeführt werden [8].

Kombiniert werden kann die Strahlentherapie mit der Chemotherapie (Radiochemotherapie).

Dieser und der alleinige Einsatz der Chemotherapie gelten als nicht zufrieden stellend [6].

Gemcitabin als Chemotherapeutikum soll nach einer Studie an 3000 Patienten, die an einem Pankreaskarzinom erkrankt waren, erfolgsversprechend die Symptomatik verbessern und den Verlauf der Erkrankung verlangsamen. Eine Heilung ist jedoch wohl nicht zu erreichen [6,10]. Die Chemotherapie kann entweder als Monotherapie (z.B. 5-Fluorouracil; Gemcitabin) oder als Kombinationstherapie (z.B. FAM oder 5-Fluorouracil/Folinsäure) eingesetzt werden. Zu den potentiell wirksamen Zytostatika mit Ansprechraten von 10-30 % zählen beim Pankreaskarzinom 5-Fluorouracil, Mitomycin C, Adriamycin, Ifosfamid und Cisplatin [7]. Während 5-Fluorouracil lange als Standardtherapeutikum für die palliative Therapie des inoperablen oder rezidivierenden Pankreaskarzinoms galt, ist Gemcitabin bei ähnlicher Wirksamkeit besser verträglich und wird daher zunehmend verwendet [4]. Die Auswertung an den 3000 erkrankten Patienten zeigte bei dieser Behandlung eine positive Auswirkung auf die Symptome (Schmerzen) und auf das Überleben. Die Gesamtansprechrates lag bei 12%, das Einjahresüberleben bei 15% [10].

Als neue Möglichkeit der Bekämpfung des Pankreaskarzinoms gilt der Einsatz von Hemmstoffen, die das Wachstum der Zellen und die tumorinduzierte Angiogenese beeinflussen. Zu diesen Hemmstoffen zählen auch Inhibitoren von Histondeacetylasen (HDACs), die eine

bedeutende Rolle für die Angiogenese und somit Tumorprogression spielen [11]. So wurde bereits nachgewiesen, dass HDAC-Inhibitoren die Proliferation transformierter Zellen unterdrücken und die Differenzierung zahlreicher transformierter Zelltypen, wie beispielsweise auch die des Kolonkarzinoms, induzieren können [12]. Die Inhibition von Histondeacetylasen wird als neuartiger Ansatz zur Behandlung maligner Tumorerkrankungen diskutiert [13]. Von Strimpakos *et al.* (2008) wurden HDAC-Inhibitoren in einer aktuellen Studie als Alternative zur Standardchemotherapie mit Gemcitabin untersucht. In neun Pankreaskarzinomzelllinien kam es durch einen HDAC-Inhibitor *in vitro* zum Arrest des Zellwachstums und zur Induktion der Apoptose. Laut dieser Studie stellen HDAC-Inhibitoren eine wichtige Möglichkeit dar, den ungünstigen Verlauf des Pankreaskarzinoms beeinflussen zu können [14].

1.2 Histondeacetylaseinhibitoren

1.2.1 HATs und HDACs

Seit etwa Mitte der 90er Jahre gewinnt der Einfluss der Chromatinstruktur auf die Regulation der Genexpression für Untersuchungen der Pathogenese der Krebsentstehung bzw. der Prävention malignen Zellwachstums zunehmend an Bedeutung. Die kleinste Einheit des Chromatingerüsts ist das Nukleosom oder Histon-Oktamer.

Es besteht aus vier unterschiedlichen Histonproteinen, die innerhalb des Nukleosoms jeweils doppelt vorkommen (2 x H2A, 2 x H2B, 2 x H3, 2 x H4) und ca. 146bp DNA (*core-DNA*). Jedes Nukleosom wird zusätzlich in einer Spiraltour von DNA-Basenpaaren (Linker-DNA) umschlungen, die benachbarte Nukleosomen miteinander verbindet. Zwischen den einzelnen Nukleosomen liegt ausserdem jeweils ein H1 Histonprotein, das der gesamten Struktur Stabilität verleiht (**siehe Abb. 1.1**).

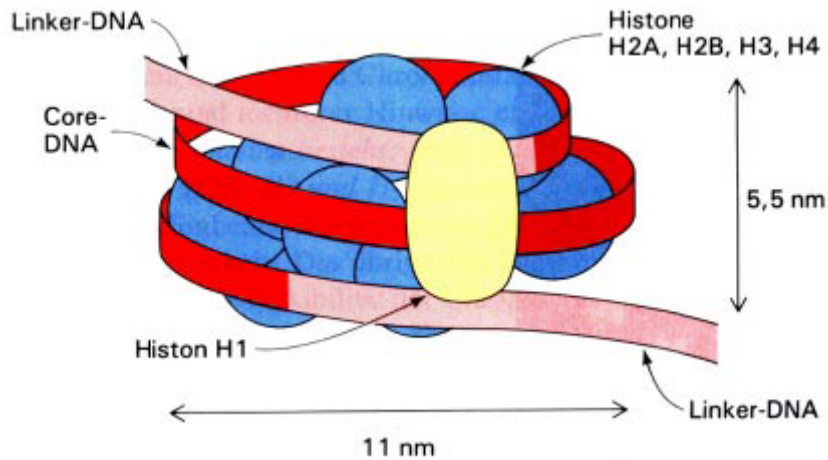


Abbildung 1.1 Struktur eines Nukleosom: Histonoktamer aus den Histonen H2A, H2B, H3 und H4 und der *core*-DNA; Linker-DNA als Verbindung zum nächsten Nukleosom; H1 Histonprotein zur Stabilisierung [15]

Das Nukleosom hat eine positive Gesamtladung und steht mit der Linker-DNA, die eine negative Gesamtladung besitzt, in enger elektrostatischer Wechselwirkung. Wird diese Wechselwirkung zwischen Nukleosom und DNA aufgehoben, gibt die DNA das Nukleosom frei für Transkriptionsfaktoren, Reparaturenzyme und DNA-Replikationsvorgänge.

Eine Aufhebung der Wechselwirkung tritt ein durch eine Änderung des Ladungszustands des Nukleosoms durch Methylierung, Phosphorylierung, Acetylierung oder Deacetylierung [16].

Die Acetylierung von Histonproteinen wird katalysiert von **Histonacetyltransferasen (HATs)**. Dabei werden Acetylgruppen auf die Lysinreste der Histone übertragen, wodurch deren positive Ladung kompensiert wird. Die Nukleosomenstruktur wird dadurch aufgelöst und es kommt zur Entspiralisierung des Chromatins. Die DNA ist so leichter zugänglich für Transkriptionsfaktoren, da sie nun histonfrei vorliegt. Acetylierte Regionen weisen somit eine hohe transkriptionelle Aktivität und dadurch eine hohe Genexpression auf.

Die Deacetylierung von Histonproteinen wird katalysiert von **Histondeacetylasen (HDACs)**. Hierbei werden Acetylgruppen hydrolytisch entfernt und somit die positive Ladung der Histone wieder freigelegt. Es kommt zur Kondensierung des Chromatins, zur Einbindung der DNA in Nukleosome und zur Repression der Transkription. Deacetylierte Regionen haben eine niedrige transkriptionelle Aktivität und damit eine niedrige Genexpression.

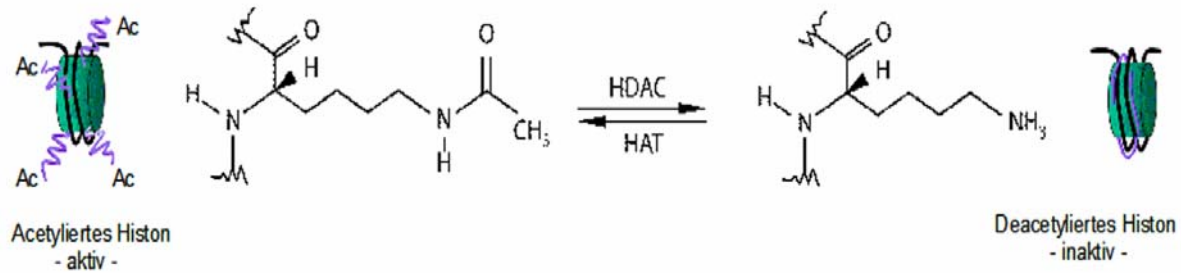


Abbildung 1.2 Reversible Histonacetylierung

Acetylierung von Histonproteinen durch HATs (Histonacetyltransferasen), Deacetylierung von Histonproteinen durch HDACs (Histondeacetylase) [17]

HATs und HDACs regulieren also die Genexpression über eine Änderung der Chromatinstruktur. Ihre gegensätzliche Aktivität kontrolliert das Ausmaß der Histonacetylierung. In normalen Zellen besteht ein Gleichgewicht zwischen HAT und HDAC Aktivität, welche zu einem zellspezifischen Genexpressionsmuster führt (**siehe Abb. 1.2**).

Eine Störung dieser Balance führt zu einer Änderung der Genexpression. Diese kann dann wiederum zu einer reduzierten Expression von Tumorsuppressorgenen führen und von Genen, die an Apoptoseinduktion, Zellzykluskontrolle oder Differenzierungsinduktion beteiligt und pathogenetisch von Bedeutung sind [13].

1.2.2 HDAC-Klassen

Erste humane HATs und HDACs wurden erst Mitte der 90er Jahre identifiziert und isoliert. In der heutigen Tumorforschung gewinnen HDACs besonders an Bedeutung, da sie an der Pathogenese einer Reihe hämatologischer und onkologischer Erkrankungen beteiligt sind und somit eine wichtige Zielscheibe molekularer Therapieansätze darstellen [16].

In Abhängigkeit ihrer Homologie zu ihren entsprechenden Proteinvorfahren in der Hefe werden HDACs in drei Substanzklassen eingeteilt. Klasse I wird abgeleitet vom Hefeprotein Rpd3, Klasse II von Hda1 und Klasse III von den Hefeproteinen Sir2, Hst1, Hst2, Hst3 und Hst4 (**siehe Tabelle 1.1**).

HDAC Gruppe	Hefe-protein	Inhibitor Sensitivität*	Humane HDACs	Inhibitor Sensitivität*
Klasse I	Rpd3	S	HDAC1	S
			HDAC2	S
			HDAC3	S
			HDAC8	S
Klasse II	Hda1	S	HDAC4	S
			HDAC5	S
			HDAC6	S
			HDAC7	S
			HDAC9	S
Klasse III	Sir2	NS	SIRT1	ND
	Hst1	ND	SIRT2	ND
	Hst2	ND	SIRT3	ND
	Hst3	ND	SIRT4	ND
	Hst4	ND	SIRT5	ND
			SIRT6	ND
			SIRT7	ND

Tabelle 1.1

Verschiedene HDAC-Klassen - Charakteristik der Histondeacetylasen HDAC, Histondeacetylase; *sensibel auf Hemmung durch die HDAC Inhibitoren TSA (Trichostatin A) oder SAHA (suberoylanilide hydroxamic acid); ND, nicht bestimmt (*not determined*); NS, nicht sensibel für die Hemmung durch TSA oder SAHA; S, sensibel für die Hemmung durch TSA oder SAHA [18]

1.2.3 Bedeutung von HDACs für die Pathogenese maligner Erkrankungen

Der reversible Prozess von Histonacetylierung und -deacetylierung wird somit in gesunden Zellen von HATs und HDACs im Gleichgewicht gehalten. Von einigen Arbeitsgruppen konnte gezeigt werden, dass sich durch HATs und HDACs vermittelte Acetylierungsvorgänge nicht allein auf Histone und Chromatinarchitektur beschränken, sondern auch auf die Aktivität vieler intrazellulärer Proteine und Signalwege Einfluss nehmen können [11,12]. Der Acetylierungsstatus spezieller Transkriptionsfaktoren kann z.B. entweder einen hemmenden oder einen aktivierenden Effekt auf die Genexpression haben. Bei Verschiebungen des Acetylierungs-/Deacetylierungsgleichgewichtes kann die Aktivität von Signalkaskaden und Transkriptionsfaktoren und somit letztendlich die Expression entsprechender Zielgene modifiziert werden. Es wird diskutiert, dass bei einem erheblichen Anteil maligner Erkrankungen Acetylierungs- bzw. Deacetylierungsvorgänge gestört sind und somit Defekte in der Histonacetylierung mit der Entstehung von Tumoren in Zusammenhang gebracht werden können [16].

Zusätzlich können Histondeacetylasen eine wichtige Rolle in Bezug auf Zellzykluskontrolle, Differenzierungs- und Apoptoseinduktion spielen oder die Expression bestimmter, für das Tumorstadium essentieller, Angiogenesefaktoren wie VEGF (*vascular endothelial growth factor*) und HIF-1 α (*hypoxia inducible factor 1 α*) steigern.

Die Bedeutung angiogenetischer Wachstumsfaktoren wie z.B. von VEGF für die Vaskularisierung und somit die Ernährung von soliden Tumoren ist allgemein bekannt. Untersuchungen zeigten beispielsweise auch, dass angiogenetische Faktoren für Pathogenese und Progression hämatologischer Neoplasien eine wichtige Rolle spielen. Angiogeneseinhibition wird schon einige Jahre als ein Teil der therapeutischen Strategie bei Leukämien diskutiert [13,18]. Erste Versuche zur Bekämpfung mehrerer Leukämieformen und auch solider Tumore über die Hemmung von HDACs durch sogenannte HDAC-Inhibitoren wurden bereits durchgeführt. Bei nur sehr geringen Nebenwirkungen zeigten diese in Zusammenhang mit Krebserkrankungen sehr vielversprechende Resultate.

Die Inhibition von Histondeacetylasen ist somit ein neuartiger Ansatz zur Behandlung maligner Tumorerkrankungen [13,16, 19].

1.2.4 HDAC-Inhibition

Die Möglichkeit, auf die Expression von Genen regulierend einwirken zu können, öffnet neue Wege auf Molekularebene, die Transkription zu „reprogrammieren“ und so sowohl Tumorzellwachstum als auch -progression zu hemmen.

Histondeacetylasen führen zur Deacetylierung der Lysinreste an den Histon-Enden der Nukleosomen und induzieren eine Hemmung der Transkription über Chromatinkondensation. Mehrere strukturell völlig unterschiedliche Verbindungen können an HDACs binden und damit die Acetylierung von Histonen verstärken. Solche Hybridmoleküle, die die Transkription spezifischer Gene aktivieren oder unterdrücken können, sind mittlerweile entwickelt und erfolgreich *in vitro* und *in vivo* getestet worden. Diese Verbindungen induzieren über die Inhibition der Histondeacetylasen eine Hyperacetylierung von Histonen, können supprimierte Gene reaktivieren und haben pleiotrope zelluläre Effekte, die das Wachstum und Überleben von Tumorzellen hemmen [16,20].

„Antitumoraktivitäten“ von HDAC-Inhibitoren:

Die Fähigkeit von HDAC-Inhibitoren, einige zelluläre Prozesse, die in neoplastischen Zellen fehlreguliert sind, zu beeinflussen, machen ihr Potential gegen Krebserkrankungen aus. Das sind in erster Linie die Aktivierung der Zelldifferenzierung, die Hemmung des Zellzyklus und die Induktion der Apoptose. Für die *in vivo* Tumorregression spielt ausserdem die Aktivierung der zentralen Immunantwort eine bedeutende Rolle.

1.) *HDAC-inhibierte Differenzierung*

Die Hemmung des Zellzyklus ist notwendig für die Enddifferenzierung von Zellen. Es konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen, die mit HDAC-Inhibitoren behandelt wurden, in der G1-Phase ihrer Entwicklung stehen bleiben, manchmal auch erst in der G2-Phase akkumulieren. Die meisten Tumorzellen, die nach Behandlung mit HDAC-Inhibitoren nicht in der G1-Phase arretieren, replizieren ihre DNA und gehen anschließend durch Apoptose zugrunde. Bei vielen Tumorzelllinien führt die Akkumulation replizierter DNA und hyperacetylierter Histone zu einer Apoptoseinduktion [13,16,20].

2.) *HDAC-inhibierte Apoptose*

Durch Apoptose, den physiologischen Zelltod, wird die normale Zellzahl kontrolliert. Dies kann über zwei verschiedene Wege erfolgen, den *death-receptor-* und den *intrinsic-apoptotic-pathway*. Für die HDAC-Inhibitor-induzierte Apoptose ist ersterer von Bedeutung, abhängig vom Zelltyp und verwendetem HDAC-Inhibitor [13,18,20].

3.) weitere Antitumoreffekte durch HDAC-Inhibitoren

Neben der Beeinflussung des Wachstums und des Überlebens von Tumorzellen, haben HDAC-Inhibitoren zusätzlich Effekte, die die Tumorentwicklung indirekt beeinflussen. So kann beispielsweise der HDAC-Inhibitor Trichostatin A die durch Hypoxie induzierte Expression des Wachstumsfaktors VEGF inhibieren und so die Angiogenese sowohl *in vitro* als auch *in vivo* hemmen. Dadurch kann das Wachstum von Primärtumoren unterdrückt und eine Metastasierung verhindert werden [13,18,20].

HDAC-Inhibitor-Klassen:

Man unterscheidet vier verschiedene Klassen von HDAC-Inhibitoren:

1. Kurzkettige Fettsäuren: Butyrat, 4-Phenylbutyrat, Valproat, α -Liponsäure
2. Hydroxamsäuren: Trichostatin A, Pyroxamide, Oxamflatin, CHAPs, SAHA
3. Cyclische Tetrapeptide: Trapoxin, Apicidin, Depsipeptide
4. Benzamide [20]

In vitro wurde gezeigt, dass kurzkettige Fettsäuren wie Butyrat oder Valproat das Zellwachstum in millimolaren Konzentrationen hemmen, wohingegen Hydroxamsäuren wie SAHA (*suberoylanilide hydroxamic acid*) oder Oxamflatin erst in mikromolaren Konzentrationen aktiv sind. Einige dieser Hydroxamsäuren wirkten in Zellkulturversuchen nachweislich antiproliferativ gegen humane Kolonkarzinomzellen. Trichostatin A (TSA) hingegen ist - wie auch cyclische Tetrapeptide - in nur nanomolaren Konzentrationen wirksam. Die vierte Klasse der HDAC-Inhibitoren, die Benzamide, hemmen Histondeacetylasen in mikromolaren Konzentrationen.

Die für einen Zellwachstumsstopp benötigte Konzentration an HDAC-Inhibitoren korreliert mit derjenigen, die zur Akkumulation acetylierter Histone nötig ist. Wachstumshemmende Effekte konnten in Bezug auf fast alle transformierten Zelltypen beobachtet werden, eingeschlossen Zelllinien hämatologischer (Leukämien, Lymphome, Myelome) wie auch epithelialer Tumore (wie beispielsweise aus Brust, Blase, Eierstock, Prostata, Lunge) [13,18,21].

Die Histone H2A, H2B, H3 und H4 wurden nachweislich nach Behandlung mit HDAC-Inhibitoren sowohl in gesunden als auch in Tumorzellen acetyliert. Der wachstumshemmende und apoptotische Effekt dieser Stoffe scheint allerdings auf transformierte Zellen beschränkt zu sein. Es konnte in Versuchsreihen gezeigt werden, dass die Behandlung gesunder humaner Zellen mit verschiedenen HDAC-Inhibitoren in Konzentrationen, die auf transformierte Zellen toxisch wirkten, nicht zur Apoptose der gesunden Zellen führte [18].

Obwohl die Histondeacetylierung eine wichtige Rolle für die Regulation der Genexpression spielt, scheinen HDAC-Inhibitoren nur die Transkription eines bestimmten Anteils von Genen zu beeinflussen [20]. Die Wirkung dieser HDAC-Inhibitoren ist dabei also selektiv; die Transkription von weniger als 2% der exprimierten Gene wird verändert [18].

Verschiedene Studien mit TSA und SAHA zeigen, dass diese Verbindungen die Aktivität von HDACs hemmen, indem sie mit dem katalytischen Ende der Histondeacetylase reagieren. Fast alle HDAC-Inhibitoren können zum Zellzyklusstop führen, zur Differenzierung oder Apoptose *in vitro* und viele haben eine stark wirksame Antitumoraktivität *in vivo*. Einige HDAC-Inhibitoren wie beispielsweise Phenylbutyrat und andere kurzkettige Fettsäuren oder das Antiepileptikum Valproat inhibieren die HDAC-Aktivität und beeinflussen dadurch die Genexpression [20,22,23]. Ihre Wirksamkeit sowohl *in vitro* als auch *in vivo* unterstreicht das Potential von HDAC-Inhibitoren als bedeutsamer neuer Wirkstoff in der Krebsbekämpfung.

HDAC-Inhibitor-Wirkung auf Zellebene:

Es wird postuliert, dass eine Acetylierung von Histonen mit einer erhöhten Transkription von Genen einhergeht. Butyrat, TSA, Oxamflatin oder auch SAHA induzieren zum Beispiel die Expression eines CDKN1A-Gens, das den Cyclin-abhängigen Kinaseinhibitor WAF1 (p21) kodiert. Über eine Hemmung der cyclinabhängigen Kinase inhibiert WAF1 die Zellzyklusprogression in der G1-Phase. Es konnte gezeigt werden, dass SAHA beispielsweise zur Akkumulation acetylierter Histone führt, was wiederum mit dem CDKN1A-Gen assoziiert ist. Dieser Anstieg korreliert mit einer zunehmenden Transkription.

Weiterhin besitzen einige Gene spezifische Bindungsstellen an ihrer Promotorregion, die HDAC-rekrutierende Transkriptionskomplexe binden und dadurch die Gentranskription hemmen. Die Aktivierung dieser „stillgelegten“ Gene über eine HDAC-Hemmung könnte zum Wachstumsstop, zur Differenzierung und/oder Apoptose transformierter Zellen beitragen [18].

HDAC-Inhibitoren im Tiermodell:

Mehrere HDAC-Inhibitoren können das Tumorwachstum nachweislich auch *in vivo* hemmen. In den meisten Studien zeigten Butyratderivate gute Ergebnisse. Diese waren jedoch nur in ziemlich hohen Dosen wirksam, was mit signifikanter Toxizität einherging. Andere HDAC-Inhibitoren wie zum Beispiel TSA oder SAHA inhibierten im Tierversuch beispielsweise Prostata-, Brust- oder Lungentumore mit nur geringer Toxizität. Auch im Tierversuch kam es zur Akkumulation acetylierter Histone in gesunden sowie transformierten Zellen, die jedoch in den normalen Zellen nicht ausreichend war, um das Zellwachstum zu hemmen [18,24].

Im Nagermodell konnte bisher unter anderem gezeigt werden, dass HDAC-Inhibitoren die Tumorprogression hemmen. Butyrat zum Beispiel inhibierte das Wachstum von Kolon-, Prostata-, Endometriums- und Gebärmutterhalskrebs. Valproat verzögerte das Wachstum von primärem Brustkrebs und minimierte die Zahl an Metastasen in der Lunge. Hydroxamsäuren wie SAHA oder TSA hemmten weiterhin das Wachstum einiger solider Tumore. Diese Einflüsse führten *in vivo* zur Histonacetylierung, induzierten die Tumorzelldifferenzierung oder Apoptose, abhängig vom Zelltyp, bei minimaler Toxizität.

Einige HDAC-Inhibitoren führten im Tiermodell ausserdem zur Hemmung der Angiogenese. Dies wurde für TSA im Versuch am Lewis-Lungenkarzinom-Modell gezeigt. Die durch Hypoxie induzierte Angiogenese und Freisetzung von HDAC1 konnte durch TSA *in vivo* unterbunden werden, indem die Bildung neuer Blutgefäße im Tumorgewebe gehemmt wurde.

Somit wird das Tumorstadium im Zuge der HDAC-Inhibition sowohl direkt unterbunden durch eine Hemmung des Zellwachstums, der Enddifferenzierung und/oder Apoptose der Zellen als auch indirekt über die Hemmung der Neovaskularisation des Tumors [13,18,20].

1.2.4.1 Der HDAC-Inhibitor α -Liponsäure

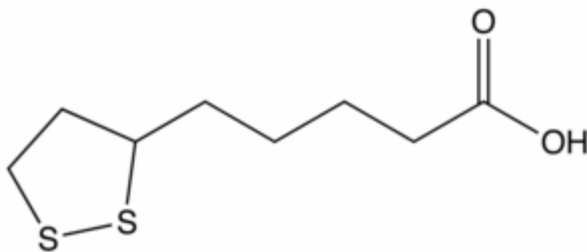


Abbildung 1.3 **Strukturformel von α -Liponsäure**

α -Liponsäure (6,8-Dithiooctansäure) ist eine lipophile Verbindung bestehend aus einer heterozyklischen Carbonsäure mit 5-gegliedertem cyclischen Disulfidring und einer Chiralachse an C6. Es existieren die beiden Enantiomere R (+) - und S (-) - α -Liponsäure. Liponsäure fungiert als Redoxsystem und ist säureamidartig als prosthetische Gruppe an einen Lysinrest des entsprechenden Enzyms gebunden [25,26].

Die kurzkettige Fettsäure wurde 1950 als Wachstumsfaktor vieler Mikroorganismen entdeckt und kommt in allen Organen vor. Sie ist für den Menschen nicht essentiell, sondern wird aus essentiellen Fettsäuren im Körper synthetisiert [26,27].

α -Liponsäure wird intrazellulär zu Dihydroliponsäure, einem Dithiol, reduziert und kommt als natürlich auftretender Co-Faktor in einer Vielzahl lebenswichtiger Multi-Enzym-Komplexe, die den Metabolismus regeln vor, wie beispielsweise der Pyruvatdehydrogenase oder der Glycindercooxylase. Aufgrund seiner starken antioxidativen und redoxregulierenden Eigenschaften wird die kurzkettige Fettsäure auch zur Behandlung von Krankheiten, die durch freie Radikale ausgelöst werden, eingesetzt, wie beispielsweise Schwermetallvergiftungen, Lebererkrankungen, Strahlenschäden oder Diabetes.

α -Liponsäure soll therapeutisch die Redoxstörungen beheben und gegen oxidativen Stress, wie er beispielsweise auch in Verbindung mit HIV-Infektionen und ischämischen Zellschäden auftritt, wirken. Als 1980 entdecktes, wirksames Antioxidans sowohl gegen wasserlösliche als auch fettlösliche Radikale werden diese durch Liponsäure in harmlose Verbindungen umgewandelt; andere Antioxidantien wie Vitamin C und E, Glutathion und Coenym Q können durch α -Liponsäure „recycelt“ werden. Die reduzierte Dihydroliponsäure scheint ein noch stärker wirksames Antioxidans zu sein [25,27-28].

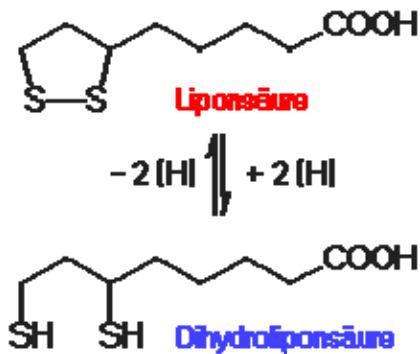


Abbildung 1.4 Intrazelluläre Reduktion von α -Liponsäure zu Dihydroliponsäure [26]

Beide Formen der Liponsäure fangen Peroxynitradikale ab, die eine wichtige Rolle in der Entwicklung von Artherosklerose, Lungenerkrankungen, chronischen Entzündungen und neurologischen Beschwerden spielen [28,29]. Aufgrund seiner Funktion als Redoxregulator von Proteinen hat α -Liponsäure unter anderem Einfluss auf Myoglobin, Prolactin oder auch den Transkriptionsfaktor NF- κ B (*nuclear factor kappa B*). Über die Änderung der NF- κ B - Aktivierung

durch α -Liponsäure kann die Signal-Transduktion und Genrepression gesteuert werden [25,30]. In einer aktuellen Studie von Lee *et al.* (2008) wurde nachgewiesen, dass α -Liponsäure in einer Konzentration von nur 1mM/L die TNF α (*tumor necrosis factor- α*) - induzierte Aktivierung von NF- κ B über den MAPK-Signaltransduktionsweg hemmte [31]. In weiteren Studien wurde die Wirkung von Liponsäure in relativ hohen Konzentrationen in Kombination mit Doxorubicin, einem toxisch wirkenden Medikament mit hohem Anteil an freien Radikalen, an L1210 Leukämiezellen von Mäusen getestet, die *in vivo* zu einer gesteigerten Überlebensrate der Tiere führte [32].

α -Liponsäure wird ausserdem als HDAC-Inhibitor diskutiert. In Versuchen von Krishna *et al.* wurde die Wirkung von α -Liponsäure zusammen mit drei weiteren kurzkettigen Fettsäuren an vier HNSCC-Zelllinien (*head and neck squamous carcinoma cells*) untersucht. Die Histondeacetylaseaktivität wurde an der Menge acetylierten Histons H4 gemessen. Zusammen mit dem HDAC-Inhibitor Arginin-Butyrat hatte Liponsäure hier die stärkste Wirkung auf das Zellwachstum, wobei einzig Liponsäure auf zwei der vier Zelllinien Einfluss nahm [33]. Eine bedeutende Arbeit von van de Mark *et al.* zeigte 2001, dass α -Liponsäure wie andere Histondeacetylaseinhibitoren eine Hyperacetylierung von Histonen *in vivo* induziert. In dieser Studie konnte nachgewiesen werden, dass die kurzkettige Fettsäure unterschiedliche Effekte auf Wachstum und Lebensfähigkeit von normalen im Vergleich zu transformierten Zelllinien aufweist. In Versuchen an der humanen Karzinomzelllinie FaDu und der humanen T-Lymphoma-Zelllinie Jurkat, wie auch an Ki-v-Ras-transformierten Balb/c-3T3 mesenchymalen Mauszellen kam es durch Behandlung mit α -Liponsäure zur Induktion der Apoptose, wohingegen eine Behandlung von nicht-transformierten Zelllinien nur einen reversiblen Arrest des Zellzyklus in der G0/G1-Phase auslöste. Die Behandlung mit Butyrat, einer weiteren kurzkettigen Fettsäure mit nachweislich bekannter HDAC-inhibitorischer Wirkung, induzierte im Gegensatz dazu einen Zellzyklusstop in G0/G1 sowohl in transformierten als auch in nicht-transformierten Zellen. Hierzu wurden FaDu-Zellen über unterschiedliche Zeitspannen mit α -Liponsäure-Konzentrationen von 1, 2 und 5 mM/L behandelt. Über 95 % der FaDu-Zellen verloren bei 5 mM/L nach 48 Stunden ihre Adhärenz, bei 2 mM/L nach 72 Stunden und bei 1mM/L kam es nach 48 Stunden zur Anhäufung der Zellen und beginnendem Ablösen vom Untergrund. Jurkat-Zellen zeigten ähnlich den FaDu-Zellen unter Behandlung mit 1 mM/L α -Liponsäure eine Induktion der Apoptose nach 24 Stunden. In Versuchen an nicht-transformierten humanen Haut-Fibroblasten Zelllinien (HDF-Zellen) kam es nach Behandlung mit α -Liponsäure zum Arrest des Zellwachstums in G0/G1 durch eine Hemmung der Zellproliferation und nicht zum Anstieg des hypodiploid DNA-Gehalts. Dieser wird als Indikator der Apoptose angesehen und war in FaDu-Zellen nach Behandlung mit 5 mM/L α -Liponsäure nach 48 Stunden deutlich erhöht. Nach 72 Stunden stieg die apoptotische Fraktion auch bei 1

und 2 mM/L α -Liponsäure-Behandlung an, jedoch gab es kein Anzeichen für eine Hemmung des Zellzyklus in diesen Tumorzellen. Die mit Butyrat behandelten Zellen zeigten dagegen ähnlich den HDF-Zellen einen Arrest in G0/G1. Letztendlich wurden die proapoptotischen Effekte von Balb/c-3T3-Zellen, einer nicht-transformierten mesenchymalen Zelllinie und der Balb/c-3T3-Zelllinie transformiert durch das Ki-v-Ras-oncogene verglichen. Die transformierten Zellen zeigten 72 Stunden nach Behandlung mit 2mM/L α -Liponsäure einen deutlichen Anstieg der hypodiploiden Zellen und waren somit signifikant stärker sensitiv für proapoptotische Effekte als die nicht-transformierten Zellen, die in G0/G1 nach 48 Stunden stoppten. Im Vergleich von α -Liponsäure mit Butyrat, welches als HDAC-Inhibitor bekannt ist, zeigt die Menge an acetyliertem H4-Histon nach Behandlung von FaDu-Zellen mit 5mM/L α -Liponsäure eine deutliche Hemmung der endogenen Histondeacetylaseaktivität, grösser als durch Butyrat. Eben solche Effekte konnten nach Behandlung von Zellen mit 5mM/L Octansäure, einem Liponsäurevorläufer, der *in vivo* auch HDAC-inhibitorische Effekte hat, beobachtet werden. Cyclin-abhängige Kinaseinhibitoren wie p21^{CIP} und p27^{KIP1} führen nachweislich auf eine Reihe von Stimuli in nicht-transformierten Zellen zum G1-Stop. Studien mit p27^{KIP1}-fehlenden MEF-Zellen zeigten, dass p27^{KIP1} im Gegensatz zu p21^{CIP} für den α -Liponsäure-gesteuerten Zellzyklusarrest benötigt wird. α -Liponsäure führt zu einem Anstieg von p27^{KIP1}, der wiederum für den durch HDAC-Inhibition induzierten Zellzyklusarrest wichtig ist. Ob die p27^{KIP1}-Induktion die α -Liponsäure-induzierte Apoptose in transformierten Zellen steuert ist noch nicht geklärt, aber seine Induktion oder Überexprimierung soll zur Einleitung der Apoptose in einigen Tumorzelltypen führen [25].

Aufgrund seiner auffallenden Spezifität in Bezug auf proapoptotische Effekte für transformierte Zellen und seiner pharmakologischen Studien zufolge guten Verträglichkeit nach oraler Applikation, sind *in vivo* Studien mit α -Liponsäure wegen der Möglichkeit seiner therapeutischen Anwendung bei tumorösen Erkrankungen als berechtigt anzusehen.

1.2.4.2 Der HDAC-Inhibitor Butyrat

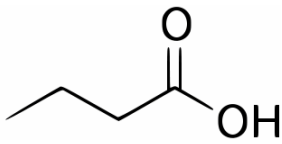


Abbildung 1.5 **Strukturformel von Butyrat**

Butyrat ist eine kurzkettige Fettsäure, die natürlicherweise im Kolon vorkommt. Als Hauptenergielieferant der Kolonmukosa wird Butyrat über bakterielle Fermentation nicht-resorbierter komplexer Kohlenhydrate im Digestionstrakt von Säugetieren gebildet. Auf normale Kolonepithelzellen hat Butyrat *in vitro* und *in vivo* nachweislich wachstumsfördernde Effekte. Im Gegensatz dazu konnte gezeigt werden, dass Butyrat in nur millimolaren Konzentrationen auf eine Vielzahl maligner Zellen wachstumshemmend wirkt und zur Induktion von Differenzierung und Apoptose führen kann. Dazu kommt es durch die Butyrat vermittelte Expression einer Vielzahl von Genen über die Hemmung von Histondeacetylasen und folglich Hyperacetylierung von Histonen [34-36].

Um die molekularen Mechanismen von Butyrat in Bezug auf die Zellproliferation und die Zelldifferenzierung zu analysieren, wurden Versuche von Siavoshian *et al.* (1999) an Kolonepithelzellen (HAT-29) durchgeführt. Dazu wurden die Kolonepithelzellen mit und ohne Butyrat und vergleichend dazu mit TSA inkubiert. Es wurde die Proliferation der Zellen, der Verlauf des Zellzyklus, die den Zellzyklus regulierenden Proteine, die Differenzierung der Zellen und die Acetylierung der Histone untersucht. Während Butyrat die Zellen hauptsächlich in der G1-Phase hemmte, griff TSA in der G1- und G2-Phase ein. Beide HDAC-Inhibitoren stimulierten ausserdem die p21-Proteinexpression auf mRNA- und Proteinebene. Eine 6-stündige Exposition der Zellen mit Butyrat oder mit TSA führte in beiden Fällen zu einer Hyperacetylierung von Histon H4. Nach 15 und 24 Stunden Inkubation blieb H4 – im Gegensatz zum Inkubationsansatz mit TSA - unter Einwirkung von Butyrat hyperacetyliert. Die unterschiedlichen Effekte von Butyrat im Vergleich zu TSA dürften mit dessen deutlich kürzerer Halbwertszeit zusammenhängen [37].

In Versuchen von Gaschott *et al.* (2001) konnte nachgewiesen werden, dass die Butyrat-induzierte Zelldifferenzierung und Hemmung des Zellwachstums von CaCo-2 Zellen nach Zugabe von 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (1,25-(OH)₂D₃, 1,25-Dihydroxycholecalciferol)

synergistisch verstärkt werden (siehe Kap. 1.3.6). 1,25-(OH)₂D₃ ist der natürliche Agonist des Vitamin D Rezeptors (VDR). In Experimenten mit dem VDR-Antagonisten ZK 191732 wurde festgestellt, dass diese Effekte mit einer - durch Butyrat induzierten - Expressionssteigerung des VDR zusammenhängen. Dies geschieht nachweislich auf mRNA - und auf Proteinebene [34]. Ebenso erfolgt die durch Butyrat induzierte gesteigerte Expression des Zellzyklusinhibitor-Gens p21^{WAF1/Cip1} über eine vermehrte Expression des VDR, welche sowohl zeit- als auch dosisabhängig zu sein scheint [34,36]. Die Regulation des Zellzyklus erfolgt über eine Familie cyclinabhängiger Kinasen (cdk), deren Aktivität von den Zellzyklusinhibitoren p21^{WAF1/Cip1} und p27^{Kip1} geändert werden kann. Während die zellwachstumshemmenden Effekte von Butyrat über p21^{WAF1/Cip1} reguliert werden, wird die Butyrat-induzierte Zelldifferenzierung und Apoptose von CaCo-2 Zellen sowohl mit p21^{WAF1/Cip1} als auch mit p27^{Kip1} in Verbindung gebracht. Wie von Gaschott *et al.* (2001) postuliert, führen Butyrat oder auch 1,25-Dihydroxycholecalciferol zur gesteigerten p21^{WAF1/Cip1} als auch p27^{Kip1} Expression, wohingegen eine Kombination aus Butyrat und 1,25-(OH)₂D₃ nur p21^{WAF1/Cip1}, jedoch nicht p27^{Kip1} ansteigen lässt. Somit kommt es über eine Expressionssteigerung des Vitamin D Rezeptors zur selektiven Steigerung der p21^{WAF1/Cip1} Expression [36] (siehe Kap. 1.3.6). In einer weiteren Studie von Gaschott *et al.* (2001) wurde weiterhin erkannt, dass Tributyrin, ein Abkömmling (*prodrug*) des natürlichen Produkts Butyrat, die antiproliferativen Effekte von Dihydroxycholecalciferol in humanen Kolonkrebszellen verstärkt. Tributyrin ist ein Vorläufer von Butyrat und eine neutrale kurzkettige Fettsäure die nachweislich *in vitro* dem Butyrat ähnliche antiproliferative, proapoptotische und differenzierungsfördernde Effekte hat, ohne dessen pharmakokinetischen Nachteile. Abhängig vom Zelltyp gilt Tributyrin als 2-4fach wirksamer als das natürliche Butyrat, ist stabil und wird schnell absorbiert. Es konnte nachgewiesen werden, dass Tributyrin in Bezug auf Wachstumshemmung und Zelldifferenzierung stärker wirksam ist als das natürliche Butyrat. Auch hier waren die Effekte nach Zugabe von 1,25-Dihydroxycholecalciferol deutlich stärker; eine gesteigerte Expression des VDR wurde auch in diesem Fall beobachtet. Diese war auch im Fall von Tributyrin dosisabhängig [35-36].

Daniel *et al.* (2004) zeigten weiterhin, dass die Butyrat-induzierte VDR-Expression in der humanen Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 über einen Mitogen-aktivierten Proteinkinase (MAPK)-Signalweg erfolgt (siehe Kap. 1.3.7). MAPK-Signalwege wie ERK, c-Jun und p38 MAPK spielen eine wichtige Rolle für die Regulierung von Zellproliferation und Zelldifferenzierung. Hierzu wurden spezifische Hemmstoffe des ERK1/2-Weges und des p38-Weges verwendet, wobei die durch Butyrat induzierte VDR-Expression durch den p38-Inhibitor SB202190 gehemmt wurde und dadurch gezeigt werden konnte, dass Butyrat über Induktion von p38-MAPK zu einer gesteigerten Expression des VDR führt [38]. Schwab *et al.* (2006) wiesen nach, dass Butyrat die Expression des nuklearen Rezeptors PPAR γ (*peroxisome proliferator activated receptor γ*) ebenso über diesen p38-MAPK-Signalweg induziert (siehe Kap. 1.3.7). PPAR γ ist nachweislich

an zahlreichen physiologischen Prozessen wie beispielsweise der Zelldifferenzierung beteiligt. In früheren Versuchsreihen konnte schon eine gesteigerte PPAR γ – Expression durch HDAC-Inhibitoren wie Butyrat oder auch Trichostatin A nachgewiesen werden. Jetzt wurde festgestellt, dass dieser Effekt unter Verwendung des p38-MAPK-Inhibitors fast völlig ausblieb, so dass Butyrat die Expression von PPAR γ eindeutig über den p38-MAPK-Weg stimuliert [39]. Dass an dem Butyrat-induzierten Anstieg von PPAR γ neben der erhöhten Genexpression möglicherweise auch eine Hemmung des Proteasoms beteiligt ist, zeigten in einer Studie Wächtershäuser und Stein (2002). Unter Verwendung von Mevastatin, einem 3-HMG-CoA-Reduktase-Inhibitor, der den proteasomalen Abbau von Proteinen inhibiert, wurde ein dosisabhängiger Anstieg der PPAR γ -Proteinexpression erzielt. Nach Zugabe von Butyrat wurde dieser Effekt nicht weiter gesteigert, so dass Mevastatin wie auch Butyrat PPAR γ wohl über den gleichen Wirkmechanismus induzieren [40]. Eine neue Untersuchung von Etzrodt-Walter bewies weiterhin die Effekte von Butyrat auf die tumorinduzierte Angiogenese kolorektaler Karzinome. Hierzu wurde als potentester Angiogenesefaktor VEGF (*vascular endothelial growth factor*), dessen Rezeptor FLT-1 und das Tumorsuppressorgen p53 untersucht. Letzteres spielt eine wichtige Rolle in Bezug auf Tumorentstehung und –progression. Nachweislich senkte Butyrat die VEGF-Expression und die Expression von FLT-1 sowohl auf RNA- und auf Proteinebene. Die Expression von p53 wurde auf RNA-Ebene ebenfalls inhibiert [41]. An Caco-2 Zellen konnte von Zgouras *et al.* (2002) ausserdem gezeigt werden, dass Butyrat die tumorzellinduzierte Angiogenese über eine Hemmung des Transkriptionsfaktors HIF-1 α beeinflussen kann. Hypoxie bedingt eine Akkumulation von HIF-1 α und anschließende Translokation des Proteins in den Nukleus, wo es zusammen mit HIF-1 β einen aktiven Komplex bildet, der zur Transkription bestimmter Gene führt. Butyrat hemmt diese nukleäre Translokation des HIF-1 α und vermindert somit dessen nukleäre Präsenz und folglich Aktivität. Dadurch kommt es zur verminderten Expression des Angiogenesefaktors VEGF, der über HIF-1 α reguliert wird, und somit durch Butyrat zu einer Hemmung der Angiogenese [42].

1.2.4.3 Der HDAC-Inhibitor Valproat

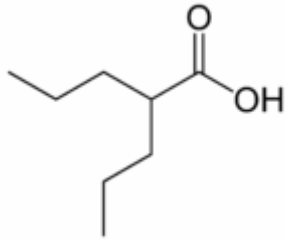


Abbildung 1.6 **Strukturformel von Valproinsäure**

Valproinsäure (Valproat, VPA) ist eine verzweigt-kettige Fettsäure bestehend aus 8 Kohlenstoffatomen. Als farblose Flüssigkeit wurde es erstmals 1882 von Burton hergestellt, aber erst 80 Jahre später auch therapeutisch eingesetzt. Seitdem wird VPA unter anderem zur Behandlung von Migräne und wegen seiner krampflösenden Eigenschaften hauptsächlich in der Epilepsitherapie verwendet. Valproinsäure ist gut oral verabreichbar, toxische Nebenwirkungen sind selten und seine Halbwertszeit ist 3-4 mal länger als die von Phenylbutyrat. Somit ist VPA als Langzeittherapeutikum sehr gut geeignet. Erst 30 Jahre nach Entdecken seiner antiepileptischen Eigenschaften wurde auch eine antikanzerogene Wirkung festgestellt. VPA hemmt nicht nur nachweislich das Tumorstadium und dessen Metastasierung, sondern induziert auch die Tumordifferenzierung sowohl *in vitro* als auch *in vivo* über eine Inhibition von Histondeacetylasen [12,22]. Beispielsweise haben zahlreiche Versuche an 293T-Zellen, Neuro-2A-Zellen und an terato-karzinogenen Fa-Zellen gezeigt, dass VPA über HDAC-Hemmung zur Hyperacetylierung von Histonen in diesen Zelllinien führt. Ebenso wird die Wirkung auf intrazelluläre Signalkaskaden und die Transkription spezifischer Gene diskutiert. Versuche an Neuroblastoma BE(2)-C-Zellen zeigten neben Effekten auf Zellwachstum und Differenzierung auch eine hemmende Wirkung auf die Tumorangio-genese, die ebenso mit einer Hemmung der HDAC-Aktivität zusammenhängt. Die vielfältigen Wirkungen von Valproat werden heute genutzt bei der Behandlung von promyelozytischen Leukämien und soliden Tumoren als auch von Kolon-, Brust-, Prostata- und neuroektodermal-entstandenen Karzinomen [12].

Auch Göttlicher *et al.* (2001) postulieren, dass VPA zur Zelldifferenzierung und/oder Apoptose von transformierten hämatopoetischen Progenitorzellen und leukämischen Blasten führt, die Induktion der Differenzierung und/oder Apoptose durch HDAC-Inhibition in transformierten

Zellen bewirkt, nicht aber auf hämatopoetische Zellen beschränkt zu sein scheint, sondern andere tumoröse Zelltypen ebenfalls empfänglich für VPA sind. Ebenso wurde im Tierexperiment die hemmende Wirkung von VPA auf das Tumorwachstum und die Metastasierung bewiesen. Es konnte gezeigt werden, dass Klasse I HDACs für eine Inhibition durch VPA signifikant empfänglicher sind als die der Klasse II. *In vitro* und *in vivo* werden die Histone H3 und H4 von VPA am N-terminalen Ende hyperacetyliert. Die HDAC-Aktivität wird durch Bindung des HDAC-Inhibitors an das katalytische Ende der Histondeacetylasen gehemmt und dadurch der Substratanfall blockiert. Laut Göttlicher *et al.* (2001) wird eine stark wirksame HDAC-Inhibition in VPA-Konzentrationen von 0,3-1,0 mM mit Verabreichung einer täglichen Dosis von 20-30 mg/kg erreicht. Die seltenen Nebenwirkungen, meist auf das zentrale Nervensystem und selten auf die Leber beschränkt, können durch Verwendung verschiedener VPA-Derivate wie beispielsweise S-4-yn-VPA reduziert werden [22]. Während der Schwangerschaft kann Valproat allerdings zu Mißbildungen des Embryos führen, so dass die Verabreichung an Schwangere als Kontraindikation anzusehen ist [22,43].

Wie in einer Studie von Krämer *et al.* (2003) gezeigt wurde, induziert VPA neben der selektiven Hemmung der katalytischen Aktivität von Klasse I HDACs zusätzlich den proteasomalen Abbau von HDAC2. VPA löst im Gegensatz zu anderen HDAC-Inhibitoren - wie beispielsweise TSA - einen proteasomenvermittelten Abbau von HDAC2 aus. In *in vitro* Versuchen an 14 Zelllinien kam es 24h nach einer Behandlung mit VPA in Konzentrationen von 0,5-1mM zur signifikanten Senkung der Proteinkonzentration von HDAC2. Eine solche zeit- und dosisabhängige Reduktion konnte für HDAC1, 3, 4, 5 und 8 nicht nachgewiesen werden. Die gleichen Ergebnisse wurden *in vivo* nach Behandlung von Mäusen mit Valproat festgestellt. Da Bedingungen, die in weiteren Versuchen mit F9-Karzinomzellen und humanen (*embryonic kidney*) HEK293T-Zellen zur Reduktion der Proteinlevel führten, die HDAC2 mRNA-Level aber nicht beeinflussten, wurde postuliert, dass VPA entweder die Proteinsynthese oder aber den Proteinabbau beeinflussen müsste. Die HDAC2-Proteinsyntheserate in F9- und HEK293 T-Zellen mit und ohne vorherige Behandlung mit VPA über 24h wurden hierzu verglichen, jedoch kein wesentlicher Unterschied der HDAC2-Syntheserate der mit VPA behandelten Zellen und der Kontrollgruppe festgestellt. Dagegen war die Proteinhalfwertszeit von HDAC2 bei Zellen, die mit VPA vorbehandelt waren, herabgesetzt. Um eruieren zu können, ob dieser HDAC2-Abbau zurückzuführen ist auf einen proteasomalen oder aber proteaseabhängigen Abbau, wurden anschließend Versuche an F9- und HEK293 T- Zellen mit speziellen Proteasomen- und Protease-Inhibitoren durchgeführt. Während die Protease-Inhibitoren keinen wesentlichen Einfluss auf die Zellreihen zeigten, führten die Proteasomen-Inhibitoren ALLN und MG132 eindeutig zur signifikanten Reduzierung des VPA-induzierten Abbaus von HDAC2. Zusammenfassend wird die HDAC-Aktivität also nicht nur über die Bindung von Inhibitoren wie VPA an das katalytische Ende der HDACs, sondern auch über eine selektive Regulation von

dessen Proteinlevel gesteuert [23]. Die Hemmung der Proteasomen-Aktivität könnte laut Zgouras *et al.* (2004) auch eine mögliche Ursache für die VPA-Effekte auf regulatorische Angiogeneseproteine wie VEGF oder FGF (*fibroblast - derived growth factor*) sein. VPA hemmt die Proteasomen-Aktivität in Kolonkarzinomzellen signifikant nach 24 Stunden. Am Zellkulturmedium konnte gezeigt werden, dass VPA die VEGF-Sekretion in CaCo2-Zellen nach einer Behandlung von 48 Stunden signifikant hemmt. Im Western Blot kam es zur Inhibition der Protein-Expression von VEGF, induziert durch Valproat dosisabhängig nach 72 Stunden. Die höchste Hemmrage wurde mit VPA-Konzentrationen von 3mM beobachtet. Die FGF-Proteinkonzentrationen in CaCo2-Zellen nahmen schon nach 48 Stunden ab. In RT-PCR-Experimenten wurde mit Konzentrationen von 3mM VPA ausserdem ein deutlicher Abfall der VEGF-mRNA-Level verzeichnet. Der HDAC-Inhibitor Valproinsäure nimmt somit auch über die Angiogeneseproteine VEGF und FGF deutlichen Einfluss auf die tumorzellinduzierte Angiogenese [44].

Die Wirkung von VPA sowie andere AEDs (*anti-epileptic-drugs*) auf das Immunsystem wurde in weiteren Versuchen von Ichiyama *et al.* (2000) untersucht. Es ist bekannt, dass der Anteil an T-Zellen im Serum von Epilepsie-Patienten, die Phenytoin erhalten, signifikant sinkt oder die pränatale Gabe von Diazepam die Proliferation der T-Lymphozyten reduziert. Ichiyama *et al.* (2000) untersuchten den Einfluss von üblicherweise genutzten AEDs wie Diazepam, Phenytoin, Phenobarbital und auch Valproat auf die Aktivierung des nukleären Transkriptionsfaktors kappa B (NF- κ B) in humanen monozytischen Leukämiezellen (THP-1) und in humanen Gliomazellen (A-172). Der NF- κ B ist bekannt als bedeutender Transkriptionfaktor für Gene, welche die kappa-Leichtketten (*kappa-light chain*) von Immunglobulinen und proinflammatorischen Zytokinen wie Interleukin (IL)-1, IL-6 oder TNF- α kodieren. In verschiedenen Versuchen konnte gezeigt werden, dass VPA im Gegensatz zu anderen AEDs die Aktivierung des NF- κ B in THP-1 und A-172 Zellen, induziert durch Lipopolysaccharid (LPS), dosisabhängig hemmt. Auch die Produktion von IL-6 und TNF- α in THP-1 Zellen und A-172 Zellen wird von VPA, induziert durch LPS, signifikant inhibiert. Dies bestätigt, dass VPA die TNF- α und IL-6 Produktion über eine Hemmung der NF- κ B-Aktivierung supprimiert und VPA somit die Immunantwort *in vitro* beeinflusst [45].

1.2.4.4 Der HDAC-Inhibitor Trichostatin A

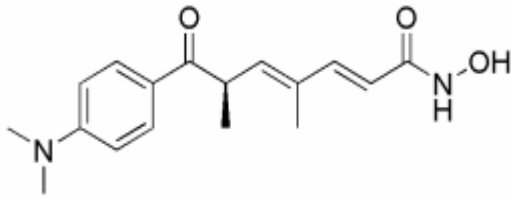


Abbildung 1.7 Strukturformel von Trichostatin A

Trichostatin A (4,6-Dimethyl-7-[p-dimethylaminophenyl]-7-oxohepta-2,4-dienohydroxaminsäure, TSA) zählt zu den Hydroxaminsäuren. Das natürliche TSA wurde aus *Streptomyces platensis* isoliert und ursprünglich als antimykotisches Medikament eingesetzt. Mittlerweile ist TSA als sehr stark und spezifisch wirksamer HDAC-Inhibitor sowohl *in vitro* als auch *in vivo* bekannt, der über die Hemmung von Histondeacetylasen und folgender Hyperacetylierung von Histonen inhibierend in den Zellzyklus eingreifen und zur morphologischen Reversion transformierter Zellen führen kann [46]. Weiterhin kommt es durch TSA zur Hemmung der tumorinduzierten Angiogenese, wozu schon nanomolare Konzentrationen von Trichostatin A ausreichend sind [18].

Die antiproliferativen und HDAC-inhibierenden Eigenschaften von TSA *in vitro* und die antikarzinogenen Eigenschaften *in vivo* wurden beispielsweise für verschiedene Brustkrebszelllinien von Vigushin *et al.* (2001) am Rattenmodell gezeigt. Insgesamt wurde in dieser Versuchsreihe eine stark dosisabhängige Antitumoraktivität von TSA in Bezug auf Brustkrebs sowohl *in vitro* als auch *in vivo* festgestellt. Trichostatin A hemmte die Proliferation von allen acht Mammakarzinomzelllinien, wobei die Behandlung mit TSA nachweislich zu einer Hyperacetylierung des Histons H4 führte [24].

In einer Studie von Moreira *et al.* (2003) wurden die pharmakologischen und antikarzinogenen Effekte von TSA auf primäre T-Zellen untersucht. TSA führte hier zur rapiden Abnahme der Zytokinexpression, zur Akkumulation von Zellen in der G1-Phase des Zellzyklus und zur Induktion der Apoptose. Weiterhin führte die Behandlung der T-Zellen zu einer geänderten Expression von Genen, die im Rahmen der T-Zellantwort eine Rolle spielen [47].

Die Wirkung von TSA auf den Zellzyklus, die Zelldifferenzierung und Apoptose wurden desweiteren von Töth *et al.* (2004) in Versuchen mit Trichostatin A an HeLa-Zelllinien

untersucht. Die Effekte auf den Zellzyklus waren abhängig von der Konzentration an TSA und der verwendeten Inkubationszeit; eine Behandlung mit verschiedenen Konzentrationen (50 und 100ng/ml) von TSA über 12 Stunden bewirkte einen Zellzyklusstop in der G1- oder in der G2/M-Phase. Nach einer Inkubation von 24 Stunden arretierten die Zellen konzentrationsabhängig in der S-Phase. Die Hemmung der Histondeacetylasen durch TSA erfolgte dabei über die Dekondensation von Chromatin in der Interphase der Zellteilung. Es konnte gezeigt werden, dass dieser Prozess reversibel ist und es bei genügend reduzierter TSA-Konzentration zur Rekondensation des Chromatins kommt. Weiterhin war die Induktion der Apoptose ebenfalls konzentrationsabhängig, wobei zur Induktion der Apoptose die gleichzeitige Hemmung drei verschiedener HDACs notwendig ist [48].

Woo *et al.* (2002) verglichen die Wirkung von TSA, sowie weiterer Klasse II HDAC-Inhibitoren wie SAHA oder Oxamflatin, mit strukturell dem TSA ähnlichen Hydroxamsäuren. Dazu wurden diese bezüglich ihrer Fähigkeit HDAC1 zu hemmen mit TSA verglichen. Einige dieser Verbindungen wiesen eine deutliche HDAC-Hemmung bei nur niedrigen nanomolaren Konzentrationen vergleichbar mit dem natürlichen TSA auf. Es konnte gezeigt werden, dass diese Verbindungen die Hyperacetylierung von Histonen in humanen T24-Krebszellen induzieren und die Proliferation in verschiedenen humanen Krebszelllinien hemmen können. Sie führten weiterhin zur Expression von p21 und zum Zellzyklusstop in humanen Krebszellen [49].

Zusammenfassend kann gesagt werden, dass HDAC-Inhibitoren bedeutsame neue Alternativen in der Krebstherapie darstellen, welche die Genexpression verändern und direkt zu Zelltod, Differenzierung und/oder Arrest des Zellzyklus von Tumorzellen führen können. Indirekt beeinflussen HDAC-Inhibitoren das Tumorwachstum nachweislich auch über eine Hemmung der Neovaskularisation des Tumors.

1.3 Hemmung der tumorinduzierten Angiogenese

1.3.1 Der physiologische Angiogeneseprozess

Unter Angiogenese versteht man das Wachstum von Blutgefäßen (Kapillaren) aus einem bestehenden Kapillarsystem durch Sprossung oder Teilung vorhandener Gefäße. Aus der während der embryonalen Vaskulogenese entstandenen primitiven Gefäßstruktur entwickelt sich hierbei ein vaskuläres Netzwerk. Neue Kapillaren entstehen durch Proliferation und Migration von vorbestehenden Endothelzellen. Die spätere Umwandlung von Kapillaren in Arteriolen, Arterien, Venolen und Venen wird durch angiogenetische Wachstumsfaktoren gesteuert. Zu diesen Wachstumsfaktoren zählen vor allem VEGF (*vascular endothelial growth factor*) und FGF (*fibroblast growth factor*) [50-54]. Alle Körperzellen sind grundsätzlich zur Neubildung von Blutgefäßen in der Lage. In gesundem Gewebe kommt es allerdings nur während der Embryogenese im weiblichen Reproduktionstrakt [54-56] und während der Wundheilung zum Angiogeneseprozess [54,57].

1.3.2 Angiogenese bei nicht-neoplastischen Erkrankungen

Beim gesunden Erwachsenen ruhen die Zellen der Gefäßstruktur (in G_0/G_1) bis auf ca. 0,01% endothelialer Zellen, die sich teilen. Exzessives oder insuffizientes vaskuläres Wachstum kann zu zahlreichen Erkrankungen, auch nicht-neoplastischer Art, beitragen. Andere Erkrankungen entstehen wenn Gefäße nicht wachsen, sondern abnormal umgeformt werden.

Hypoxie ist hierbei ein starker Stimulus pathologischer Angiogenese und vaskulärer Umformung. Zellen werden hypoxisch, wenn sie sich zu weit entfernt von benachbarten Gefäßen befinden oder auch bedingt durch vaskuläre Abtrennung z.B. bei Hypertension [48-49]. Weiterhin kommt es zur Hypoxie bei akuten oder chronischen vaskulären Erkrankungen, respiratorischen Erkrankungen oder Krebs [58]. Zahlreiche Studien zeigen, dass Hypoxie zur Aktivierung der HIFs führt, die hierbei eine bedeutende Rolle spielen und die Expression mehrerer angiogenetischer Faktoren z.B. VEGF induzieren [54,58-60]. Neben der Angiogenesestimulation führt Hypoxie aufgrund der Imbalance zwischen Vasodilatoren und Vasokonstriktoren zur vaskulären Umformung. Ein weiterer Stimulus lang andauernder und exzessiver Angiogenese sind entzündliche Erkrankungen. Entzündungszellen wie Monozyten, Makrophagen oder Mastzellen setzen mehrere Angiogenesefaktoren frei wie beispielsweise VEGF, bFGF (*basic fibroblast growth factor*), Ang1 (Angiopoietin-1), TGF- β 1 (*transforming*

growth factor-β1), PDGF (*platelet-derived growth factor*), TNF-α (*tumor necrosis factor-α*) oder IGF-1 (*insulin-like Growth Factor 1*). Einige dieser Faktoren führen zur Chemotaxis von Zellen, die weitere angiogenetische Faktoren abgeben können. Dazu zählen beispielsweise Psoriasis und rheumatoide Arthritis [50,57,61,62]. Weiterhin spielt die Angiogenese auch bei fettleibigen Patienten eine bedeutende Rolle. Der Angiogeneseprozess kann zur Akkumulation von Körperfett bei fettleibigen Individuen beitragen, da Präadipozyten in neovaskularisierte Gebiete migrieren und fetthaltige Zellkulturen ausserdem stark angiogenetisch wirksam sind. VEGF, bFGF und Leptin konnten als Angiogenesemediatoren in fetthaltigen Zellkulturen identifiziert werden. In diesem Zusammenhang wird auch die Möglichkeit antiangiogenetischer Therapien zur Behandlung fettleibiger Patienten diskutiert [62]. Von großer Bedeutung ist die Angiogenese weiterhin bei pathophysiologischen Vorgängen wie der Endometriose [63] und der diabetischen Retinopathie [64].

1.3.3 Angiogenese und Tumorentstehung

1.3.3.1 Der *Angiogenic Switch*

Die Beobachtung, dass Angiogenese und Tumorentstehung zusammenhängen wurde schon vor fast 100 Jahren gemacht. 1971 postulierte Judah Folkman, dass Tumorwachstum und Metastasierung angiogeneseabhängig sind und daher eine Blockierung der Angiogenese eine Strategie darstellen könnte, das Tumorwachstum zu hemmen. Daraufhin gewannen pro- und antiangiogenetische Moleküle in der Tumorforschung an Bedeutung [54,65].

Im Normalfall stehen diese miteinander im Gleichgewicht und es findet kein sogenannter *angiogenic switch* statt; überwiegen sie zugunsten der Angiogenese, so wird der *angiogenic switch* aktiviert und die endotheliale Zellproliferation und Migration setzt ein. Der *angiogenic switch* ist ein einzelner Schritt in der Tumorentwicklung, der in unterschiedlichen Stadien der Tumorprogression eintreten kann. Die meisten Tumore liegen zu Beginn ihrer Entstehung avaskulär und „schlafend“ vor (siehe Kap. 1.3.3.2) bis ein stabiles Level an Zellen, die proliferieren und durch Apoptose zugrunde gehen, erreicht ist. Der *angiogenic switch*, die Induktion der Angiogenese, muss erfolgen, um ein exponentielles Tumorwachstum zu gewährleisten. Es kommt dabei zu einer perivaskulären Abtrennung und Dilatation von Gefäßen, folgender Sprossung, neuer Gefäßformation, Reifung und letztlich zur Verstärkung perivaskulärer Zellen. Die Blutgefäßneubildung dauert ebenso lange wie das Tumorwachstum. Die Blutgefäße versorgen hypoxische und nekrotische Areale des Tumors mit Nährstoffen und Sauerstoff und sorgen damit für dessen Wachstum (**siehe Abb. 1.8**) [66].

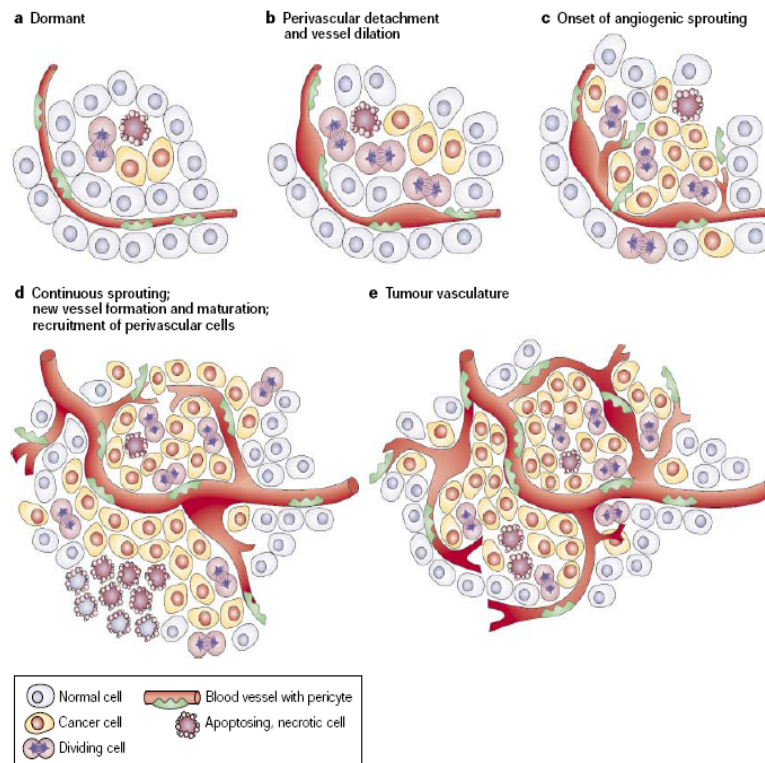


Abbildung 1.8 Angiogenic Switch
a. tumor dormancy
b. perivaskuläre Abtrennung und Gefäßdilatation
c. Sprossung
d. Gefäßformation, Reifung und Verstärkung perivaskulärer Zellen
e. Tumolvaskularisation und Progression [66]

Die für den *angiogenic switch* bedeutenden pro- und antiangiogenetischen Moleküle entstammen Krebszellen, endothelialen oder stromalen Zellen, Blut oder der extrazellulären Matrix. Ihre Einwirkung auf die Tumorentwicklung ändert sich in Abhängigkeit von Tumortyp und Tumorlokalisation, ausserdem von Tumorwachstum, -regression und -rezidiv. Signale, die zum „Switch“ führen, können metabolische Stressfaktoren sein, wie beispielsweise ein geringer O₂-Gehalt, ein niedriger pH-Wert oder Hypoglykämie, oder auch mechanischer Stress, zum Beispiel durch äusseren Druck von proliferierenden Zellen; ebenso kann es durch eine Infiltration von inflammatorischen Zellen oder Zellen des Immunsystems zum *angiogenic switch* kommen. Auch genetische Mutationen wie die Aktivierung von Onkogenen oder die Inaktivierung von Tumor-Suppressor-Genen, welche die Produktion von Angiogeneseregulatoren kontrollieren, können diesen Switch zugunsten der proangiogenen Faktoren bewirken [62]. Zu den relevantesten proangiogenen Faktoren zählen das VEGF-System, die Ephrine sowie das Angiopoietin System (**siehe Tabelle 1.2**).

Proangiogenetische Faktoren *	Antiangiogenetische Faktoren
Angiogenin Angiopoetin-1 Del-1 Fibroblast growth factor, acidic (aFGF) Fibroblast growth factor, basic (bFGF) Follistatin Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF) Hepatocyte growth factor (HGF) [†] Interleukin-8 (IL-8) Leptin Midkine Placental growth factor (PlGF) Platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF) Platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB) Pleiotrophin (PTN) Proliferin Transforming growth factor-alpha (TGF- α) Transforming growth factor-beta (TGF- β) Tumor necrosis factor-alpha (TNF- α) Vascular endothelial growth factor (VEGF) [‡]	Angiostatin (plasminogen fragment) Antiangiogenic antithrombin III Cartilage-derived inhibitor (CDI) CD59 complement fragment Endostatin (collagen XVIII fragment) Fibronectin fragment Gro-beta Heparinases Heparin hexasaccharide fragment Human chorionic gonadotropin (hCG) Interferon alpha, beta, gamma Interferon inducible protein (IP-10) Interleukin-12 (IL-12) Kringle 5 (plasminogen-fragment) Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) 2-Methoxyestradiol Placental ribonuclease inhibitor Plasminogen activator inhibitor Platelet factor 4 (PF4) Prolactin 16kD fragment Retinoids Tetrahydrocortisol-S Thrombospondin-1 (TSP-1) Transforming growth factor beta (TGF- β) Vasculostatin Vasostatin (calreticulin fragment)
<p>* Faktoren, von denen bekannt ist, dass sie Endothelzellwachstum und -bewegung aktivieren</p> <p>[†] Synonym: scatter factor (SF)</p> <p>[‡] Synonym: vascular permeability factor (VPF)</p>	

Tabelle 1.2

Pro- und antiangiogenetische Faktoren
[54]

1.3.3.2 Die tumorinduzierte Angiogenese

Solide humane Tumore können über Jahre aufgrund eines Gleichgewichtes zwischen Zellproliferation und Apoptose im Körper „schlafend“ vorliegen (*tumor dormancy*) [67,68]. Für das Tumorwachstum und die Tumorweiterentwicklung ist der Angiogeneseprozess essentiell, denn um über eine bestimmte Größe (1-2 mm³) hinauszuwachsen benötigt der Tumor Blutgefäße zur Versorgung mit O₂ und Nährstoffen (siehe Kap. 1.3.3.1) [65,69,70]. Die Versorgung erfolgt primär über Diffusion aus nahe gelegenen Blutgefäßen bis zum Zeitpunkt des *angiogenic switch* [66,67,69]. Es kommt zur Ausschüttung von proangiogenetischen Faktoren wie beispielsweise VEGF oder FGF durch den Tumor, z.B. aufgrund der entstandenen Hypoxie im Tumorrinneren oder aufgrund von mechanischem Stress wie erhöhtem Druck durch die proliferierenden Tumorzellen. Die sezernierten Wachstumsfaktoren binden an Endothelzellen benachbarter Blutgefäße und führen zu deren Aktivierung. Daraufhin werden im Nukleus dieser aktivierten Endothelzellen wiederum Enzyme wie beispielsweise Matrix Metalloproteinasen (MMP's) produziert, welche die extrazelluläre Matrix und die Basalmembran dieser Blutgefäße abbauen.

Anschließend kommt es zur Proliferation der Endothelzellen und zu ihrer Migration durch die entstandenen Öffnungen in der Wand der Blutgefäße in Richtung auf den Wachstumsfaktorstimulus. Diese Wanderung der neuen endothelialen Zellen wird über Adhäsionsmoleküle oder Integrine gesteuert; zusätzlich werden Enzyme freigesetzt, die das umgebende Gewebe auflösen.

Für die Differenzierung, Reifung und das Überleben der Blutgefäße ist das als Adhäsionsrezeptor fungierende Integrin $\alpha_v\beta_3$ verantwortlich, das auf der Oberfläche aktivierter Endothelzellen präsentiert wird. Die neugebildeten Endothelzellen organisieren sich und formen neue Blutgefäße; strukturellen Halt erhalten sie durch Perizyten, die das umgebende Stützgewebe bilden. Anschließend entstehen Anastomosen, die neugebildeten Gefäße verbinden sich zu komplexen Netzwerken und Kreisläufen, so dass zirkulierender Blutfluss stattfinden kann. So kann eine Blutversorgung in Richtung des Gewebes gesichert werden, das initial den proangiogenen Stimulus freisetzt. Die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung der Zellen des Primärtumors ist gesichert und die Zellen können ungehindert proliferieren.

Die Neovaskularisation eines soliden Tumors ist darüber hinaus essentiell nicht nur für das Tumorwachstum, sondern auch für die dadurch mögliche hämatogene Metastasierung [54,69].

Die Hemmung der tumorinduzierten Angiogenese ist somit eine vielversprechende Therapiemöglichkeit, um sowohl die Progression des Tumors als auch dessen Metastasierung zu unterbinden [65,66,69].

1.3.3.3 Tumorgefäßformation

Embryonal angelegte Gefäße entstammen endothelialen Vorläuferzellen. Diese Art der (Neu-) Bildung von Blutgefäßen bezeichnet man als Vaskulogenese. Dieses primitive Gefäßnetz erweitert sich über Sprossung (Angiogenese) oder Intussuszeption, während welcher interstitielle Zellkolonnen in das Lumen bereits existierender Gefäße einwachsen und das Gefäßlumen teilen. Während der Tumorangiogenese können sich Tumorgefäße über die Teilung oder Intussuszeption schon vorhandener Gefäße entwickeln. Ebenso können Tumorzellen um bereits existierende Gefäße herumwachsen und eine perivaskuläre Manschette bilden. Zirkulierende endotheliale Vorläufer, die der Gefäßwand entstammen oder vom Knochenmark mobilisiert werden, können ebenso zur Tumorangiogenese beitragen (**Abbildung 1.9**).

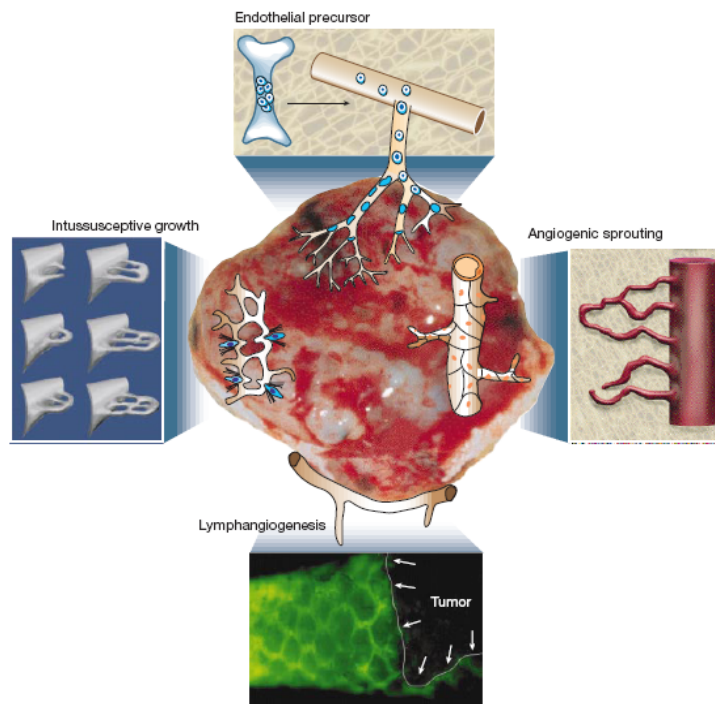


Abbildung 1.9 **Verschiedene Mechanismen der Tumorangiogenese:**
Angiogenese: das vaskuläre Netzwerk erweitert sich durch Knospung endothelialer Sprossen oder der Ausbildung von Brücken;
Intussuszeption: Tumorgefäße bilden sich um und erweitern sich durch die Anheftung an interstitielle Zellspalten im Lumen bereits bestehender Gefäße;
Vaskulogenese: endotheliale Vorläuferzellen (Angioblasten) aus Knochenmark oder peripherem Blut gelangen in den Tumor und tragen zur endothelialen Auskleidung der Tumorgefäße bei;
Lymphangiogenese: Lymphgefäße im Tumorbereich leiten die interstitielle Flüssigkeit ab und bilden eine Abflußmöglichkeit für metastasierende Tumorzellen [62]

Insgesamt sind verschiedene molekulare Mitspieler in diesen differenzierten Mechanismus des vaskulären Wachstums involviert; daneben spielen verschiedene vaskuläre endotheliale Wachstumsfaktoren wie VEGF oder Angiopoietin eine bedeutende Rolle und auch eine Reihe von Angiogeneseinhibitoren scheinen bei der Tumorangiogenese involviert zu sein [62,66,70,71].

Die zeitliche und räumliche Expression dieser Regulatoren ist während der Tumorentstehung nicht so gut reguliert wie im physiologischen Angiogeneseprozess. Zusätzlich fehlen Tumorgefäßen gewisse protektive Mechanismen, die normale Gefäße während ihres Wachstums erhalten. Weiterhin ist die Gefäßwand der Tumorgefäße nicht immer homogen mit endothelialen Zellen ausgekleidet, sondern mit Krebszellen oder einer Art Mosaik aus Krebszellen und endothelialen Zellen. Diese Krebszellen könnten entweder ins Gefäßlumen eingedrungen sein, endotheliale Zellen nachahmen (*vasculogenic mimicry*) oder unter endothelialen Zellen liegend durch deren Apoptose aufgedeckt worden sein. Die Präsenz der Krebszellen in Tumorgefäßen hat jedenfalls eine bedeutende Auswirkung auf die Metastasierung und die Art der antiangiogenetischen Therapie. Strukturell und funktionell unterscheiden sich Tumorgefäße gravierend von der normalen Gefäßstruktur. Das Tumorgefäßnetz erscheint insgesamt „unorganisiert“, einzelne Gefäße verlaufen geschlängelt und verästelt, sind stellenweise erweitert oder besitzen *shunts*. Das führt unter anderem auch zu einer Imbalance angiogenetischer Regulatoren wie VEGF oder Angiopoietin. Weiterhin hat diese Struktur Auswirkungen auf den Blutfluss, der nicht in allen Regionen des Tumors zu gleichen Teilen gewährleistet ist und zu hypoxischen Bereichen führt. Die Hypoxie bedingt die Vermehrung von Zellen, die ihre Fähigkeit zur Apoptose bereits verloren haben. Zusätzlich steuern diese Bedingungen die Produktion angiogenetischer Stimulatoren sowie Inhibitoren und deuten auf Krebszellen hin, die maligne und metastasierend sind. Die therapeutische Effektivität ist ausserdem erniedrigt. Tumorgefäße sind weiterhin unterschiedlich zu normalen Blutgefäßen bezüglich ihrer Ultrastruktur. Ihre Gefäßwände zeigen „Undichtigkeiten“, erweiterte zwischenendotheliale Verbindungen und diskontinuierliche oder gar fehlende Basalmembran. Tumore mit hoher Durchlässigkeit entbehren Angiopoietin 1 oder überexprimieren seinen Antagonisten Angiopoietin 2, während Tumore mit geringer Durchlässigkeit Angiopoietin 1 über- und VEGF bzw. seinen homologen plazentalen Wachstumsfaktor PIGF (*placental growth factor*) unterexprimieren. Die Oberflächenstruktur von Tumorgefäßen ist desweiteren uneinheitlich, was an der Expression der entsprechenden Adhäsionsmoleküle liegt. Die Expression zellulärer Adhäsionsmoleküle und anderer Oberflächenmarker auf dem Endothel von Tumoren wird von Cytokinen und angiogenetischen Molekülen gesteuert, die von Krebs- und Immunzellen sezerniert werden. So steigern z.B. VEGF und TNF- α die Expression der Adhäsionsmoleküle, während bFGF und TGF- β 1 diese Expression hemmen [62,66].

1.3.4 Die Wachstumsfaktoren VEGF und FGF

VEGF ist ein Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 45 kDa und auch bekannt als *vascular permeability factor* (VPF). Zur VEGF-Familie zählen: VEGF, PlGF, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D und VEGF-E. VEGF bindet an zwei Rezeptorsubtypen (VEGF-Rezeptor-1 und VEGF-Rezeptor-2), die auf vaskulären Endothelzellen exprimiert werden und Tyrosinkinaseaktivität besitzen. VEGF wird unter physiologischen Bedingungen darüber hinaus in Makrophagen, T-Zellen, glatten Muskelzellen, Nierenzellen, mesangialen Zellen, Keratinozyten, Astrozyten, Osteoblasten und Tumorzellen exprimiert. Als grundlegender Mediator physiologischer und pathologischer Angiogenese steuert der Wachstumsfaktor im gesunden Organismus die Angiogenese und Vaskulogenese während der embryonalen Entwicklung und der Wundheilung. Er ist unter anderem erforderlich für die zyklische Blutgefäßformation im weiblichen Reproduktionstrakt, für das longitudinale Knochenwachstum und die endochondrale Knochenformation. VEGF-Konzentrationen im Kammerwasser oder im Glaskörper sind bei pathologischen Erkrankungen wie proliferativen Retinopathien oder diabetischer Retinopathie erhöht. In der Krebsentstehung ist VEGF von grosser Bedeutung und führt als proangiogenetischer Faktor zum *angiogenic switch*. Zur gesteigerten VEGF-mRNA Expression kommt es durch eine Vielzahl von Wachstumsfaktoren (wie Zytokine, TGF- β , EGF (*epidermal growth factor*), KGF (*keratinocyte growth factor*)), die Expression von Onkogenen und vor allem bei Hypoxie. Im Nacktmausmodell konnte bereits eine Hemmung des Wachstums vieler Tumorzelllinien durch monoklonale anti-VEGF Antikörper *in vivo* gezeigt werden [54,70,71]. Neben VEGF spielt der FGF eine Rolle als Wachstumsfaktor. FGFs sind bedeutende Regulatoren der Zellproliferation, Migration und Differenzierung, zB. während der Embryogenese und der Wundheilung, aber auch unter pathologischen Bedingungen wie dem Tumorwachstum und der Tumorangiogenese [72,73].

1.3.5 Der Transkriptionsfaktor HIF-1 α

Der Transkriptionsfaktor HIF-1 (*hypoxia inducible factor-1*) spielt eine zentrale Rolle bei der Regulation der O₂-Homöostase und im Rahmen der Steuerung der zellulären Antwort auf Hypoxie. Unter Sauerstoffmangel aktiviert HIF-1 mehr als 40 verschiedene Gene, die wichtig sind für Überleben und Anpassung an die hypoxischen Bedingungen [74]. HIF-1 ist ein Heterodimer bestehend aus zwei Untereinheiten, HIF-1 α und HIF-1 β . HIF-1 β wird kontinuierlich *va.* im Nukleus exprimiert und hat Anteil an verschiedenen zellulären Prozessen, während HIF-1 α spezifisch ist für die hypoxische Antwort [74,75].

Zusätzlich zur Hypoxie sind eine Vielzahl an Faktoren als Regulatoren der HIF-1 α -Expression bekannt, einschließlich reaktiver O₂-Spezies, Stickstoffmonoxid (NO), Zytokine und Wachstumsfaktoren. Die Regulation des HIF-1 α -Proteins sowohl über Hypoxie als auch über andere Faktoren schließt eine Aktivierung des PI3K/AKT- (Phosphoinositol 3-kinase / Serin/Threonin Kinase) Systems und/oder eine Phosphorylierung durch p42/p44 MAP-Kinase mit ein [76]. Die Aktivierung von HIF-1 α wird reguliert über verschiedene post-translationale Steuerungen wie Hydroxylierung, Acetylierung und Phosphorylierung [75].

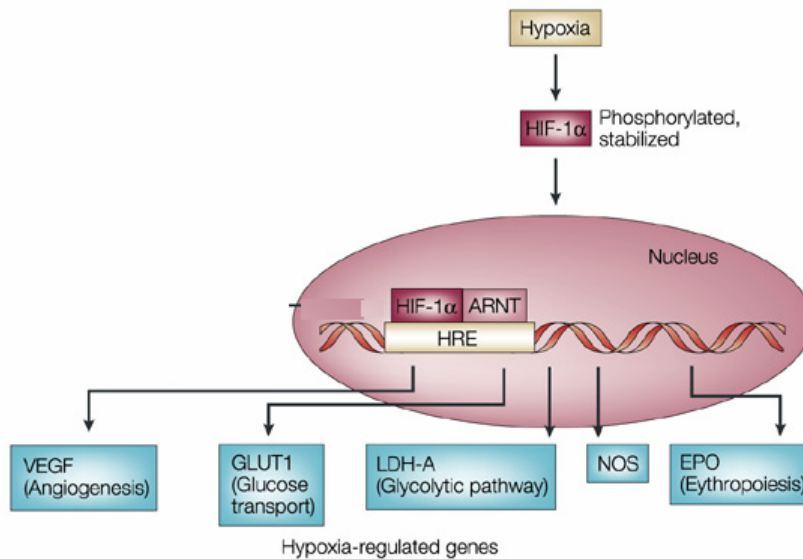
In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass ein Anstieg von HIF-1 α mit ungünstiger Prognose bei verschiedenen Krebsarten korreliert. Shibaji *et al.* (2003) zeigten, dass HIF-1 α im humanen Pankreaskarzinom vermehrt exprimiert wird und sowohl die Angiogenese als auch die Progression des Tumors fördert. Der HIF-1 α -Gehalt im Tumor korrelierte in 55 Fällen von Patienten, die an einem Pankreaskarzinom erkrankt waren, signifikant mit der Metastasierung, der VEGF-Expression sowie der intramuralen Gefäßdichte und kann auch genutzt werden, um eine Aussage bezüglich der Prognose der Erkrankung bei solchen Patienten zu treffen [77].

HIF-1 α – Aktivität bei Normoxie und unter Hypoxie

Während Normoxie zum raschen Abbau von HIF-1 α über das Ubiquitin-Proteasomen-System führt, wird dieser Abbau unter Hypoxie gehemmt und HIF-1 α stabilisiert. Der physiologische Abbau wird gesteuert über ein Produkt von von-Hippel-Lindau (vHL) Tumorsuppressorgenen, die eine Komponente des Ubiquitin E3 Ligase Komplexes darstellen und somit essentiell sind für den Abbau über das Ubiquitin-Proteasomen-System. Die vHL-Erkennung ist abhängig von der enzymatischen Hydroxylierung der entsprechenden Prolyl-Reste des HIF-1 α -Proteins. Hier konnte von verschiedenen Arbeitsgruppen gezeigt werden, dass diese O₂-abhängige Hydroxylierung über eine Familie von 3 Prolyl-Hydroxylasen gesteuert wird, die zu den α -ketoglutarat-abhängigen Dioxygenasen gehören und bezeichnet werden als HIF-Prolyl-Hydroxylasen. Ihre Aktivität hängt von der O₂-Verfügbarkeit ab [74-76,78].

Während diese Hydroxylierung des HIF-1 α -Proteins unter Normoxie zur vHL-Erkennung und zum weiteren Abbau über das Ubiquitin-Proteasomen-System führt, wird die Degradation von HIF-1 α unter hypoxischen Bedingungen gehemmt und der Transkriptionsfaktor stabilisiert. HIF-1 α akkumuliert im Zytosol und transloziert von dort in den Nukleus, wo es einen aktiven Komplex mit HIF-1 β bildet. Im Nukleus können jetzt Hypoxie-sensitive Gene über die Bindung an Promoter/Enhancer-Regionen aktiviert werden [78]. Die physiologischerweise niedrigen Level von HIF-1 α unter normoxischen Bedingungen können keine Heterodimerbildung und somit keine Transkriptionsaktivierung ermöglichen [74]. HIF-1 α fördert neben der Expression von Genen, die zur metabolischen Adaptation an die Hypoxie benötigt werden, auch die

Expression der Gene, die für Wachstumsfaktoren kodieren, Wachstumsfaktorrezeptoren, Komponenten des apoptotischen *pathways* und Zellzyklusregulatoren [78]. VEGF zum Beispiel beinhaltet eine Reihe von HIF-1 α -Bindungsstellen. HIF-1 α kann den VEGF-Promoter aktivieren und somit zur gesteigerten Expression von VEGF führen. Dies wiederum resultiert, wie schon vorher beschrieben, in der Induktion der Neovaskularisation und somit Wachstum des Tumors [76] (siehe **Abbildung 1.10**).



Nature Reviews | Cancer

Abbildung 1.10 Regulation von VEGF durch HIF-1 α

Hypoxie führt zur Phosphorylierung und Stabilisierung von HIF-1 α und darauf folgender Translokation in den Nucleus; Interaktion von HIF-1 α mit ARNT (aryl hydrocarbon receptor nuclear translocator, HIF-1 β); Bindung an HRE (hypoxia responsive element); Aktivierung der Transkription von Zielgenen: VEGF, Glut-1 (glucose transporter-1), LDH-A (lactat dehydrogenase), NOS (nitric oxide synthase), EPO (erythropoietin) [58]

Die Beseitigung des HIF-1 α Gens oder die Unterbrechung der HIF-1 α Transkription resultiert in einem Mangel an VEGF-Sekretion durch die Tumorzellen, einer Hemmung der Angiogenese und Hemmung des soliden Tumorwachstums [76].

Da HIF-1 α neben der Expression von Genen, die im Rahmen der Angiogenese involviert sind, auch Gene reguliert, die zum Überleben und zur Aggressivität von Tumorzellen beitragen, gilt der Transkriptionsfaktor als bedeutendes Ziel antineoplastischer Therapie [78]. Dies schließt ebenso die Hemmung von Hypoxie-induzierter Aktivierung von HIF-1 α über eine Aktivierung von HIF-Hydroxylasen als neuartige therapeutische Strategie mit ein, einschließlich Gentransfers, der auf der Aktivierung von HIF-Prolyl-Hydroxylasen basiert [74].

1.3.6 Vitamin D Rezeptor

Eine bedeutende Rolle bei der Vermittlung von differenzierungsfördernden und antineoplastischen Effekten auf eine Vielzahl von normalen sowie neoplastischen Zellen spielt der Vitamin D Rezeptor (VDR). Dieser ist lokalisiert in den klassischen Vitamin D-sensitiven Geweben wie Knochen, Nieren und Interstitium und wurde ebenso in mehreren anderen normalen Geweben wie auch verschiedenen Krebszelllinien nachgewiesen.

Über die Bindung von Liganden an den VDR und folglich die Bindung des VDR-retinoid X-Rezeptor (RXR)-Komplexes an einzelne Promotorsequenzen von Vitamin D-Zielgenen, kann die Transkription zahlreicher Gene reguliert werden, die unter anderem an der DNA-Replikation, Apoptose und Differenzierung beteiligt sind [34,79].

Als natürlicher Agonist des VDR hat 1,25-Dihydroxycholecalciferol / 1,25-Dihydroxyvitamin D₃ (1,25(OH)₂D₃) als aktive Form von Vitamin D₃, differenzierungsfördernde Effekte auf eine Vielzahl von normalen und neoplastischen Zellen. Durch Bindung von 1,25(OH)₂D₃ an den VDR werden ebenso auch Gene reguliert, die an der Calcium- und Phosphoregulation und am Vitamin D Metabolismus beteiligt sind.

Gaschott *et al.* zeigten 2001, dass die antineoplastischen Effekte von Butyrat auf CaCo-2 Zellen teilweise in Zusammenhang stehen mit der synergistischen Aktion von Butyrat mit 1,25(OH)₂D₃. In mehreren neoplastischen Zelllinien wurde eine Hemmung des Zellwachstums und die Induktion der Differenzierung unter anderem von CaCo-2 Zellen gezeigt [34,79]. Dieser Effekt scheint Rezeptor-vermittelt zu sein, da eine Hemmung des Tumorstwachstums bei Fehlen des VDRs nicht beobachtet wurde. Die synergistische Wirkung resultiert aus der Butyrat-induzierten up-Regulation des VDR, die sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene nachgewiesen werden konnte. In Untersuchungen, in denen der VDR-Antagonist ZK 191732 verwendet wurde, konnte somit auch keine Änderung im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden (siehe Kap. 1.2.4.2).

Die wachstumshemmenden, apoptose- und differenzierungsinduzierenden Effekte sowohl von Butyrat als auch 1,25(OH)₂D₃ stehen in Zusammenhang mit der gesteigerten Expression zweier bedeutender Negativ-Regulatoren des Zellzyklus (cdk-Inhibitoren) p21^{Waf1/Cip1} und p27^{Kip1}. Während p21^{Waf1/Cip1} in die spontane und induzierte Differenzierung von CaCo-2 Zellen involviert ist, ist p27^{Kip1} an der Induktion der Apoptose in dieser Zelllinie beteiligt. Laut Gaschott *et al.* (2001, 2003) ist p21^{Waf1/Cip1}, nicht aber p27^{Kip1}, der wichtigste Negativ-Regulator des Zellzyklus bei spontaner und induzierter Differenzierung durch Butyrat. Die Arbeitsgruppe zeigte auch hier, dass Butyrat allein zum Anstieg der p21^{Waf1/Cip1}-Expression führt und eine Kombination von Butyrat und 1,25(OH)₂D₃ eine synergistische Steigerung der p21^{Waf1/Cip1}-Expression hervorrufen, während unter Verwendung des VDR-Antagonisten ZK 191732 keine Änderung im Vergleich zur Kontrolle festgestellt werden konnte [34,36,79].

Weiter wurde die Proteinexpression von Cyclinen, cdk6 und von cdk-hemmenden Proteinen untersucht. Cdk6 und cyclinA, die beide im Rahmen der Zellzyklusprogression involviert sind, wurden unter Behandlung mit Butyrat gehemmt und diese Hemmung bei kombinierter Behandlung mit Butyrat und $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ synergistisch verstärkt, während unter Zugabe von ZK191732 keine Änderung verglichen mit der Kontrolle auftrat. Ein Arrest des Zellzyklus in der G1-Phase wurde bei kombinierter Behandlung von Zellen mit Butyrat und ZK 191732 ebenfalls nicht beobachtet [66]. Diese Ergebnisse zeigen, dass die Butyrat-induzierte Differenzierung und ein Zellzyklusstop in G₁ über eine verstärkte Expression des VDR gesteuert werden, gefolgt von einer Stimulation von p21^{Waf1/Cip1} und der verminderten Expression von cdk6 und cyclin A in CaCo-2-Zellen, die wiederum die Zellzyklusprogression hemmen [34,79].

Das natürliche Vorkommen des VDR im menschlichen Körper und die Tatsache, dass $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ als natürlicher Agonist des VDR fähig ist, das Zellwachstum und die Differenzierung zu beeinflussen, machen dieses Hormon zum interessanten Wirkstoff in der Behandlung von Krebserkrankungen. Da meist pharmakologische Konzentrationen von Vitamin D nötig sind, um die zelluläre Proliferation zu hemmen und die Differenzierung zu induzieren, was wiederum hyperkalzämische Nebeneffekte verursachen könnte, kann die Nutzung von Medikamentenkombinationen wie Vitamin D und Butyrat sinnvoll sein [80]. Von Gaschott *et al.* wurde 2001 weiterhin die Wirkung des Vitamin D-Analogs ZK 156718 untersucht, um die Nebenwirkung der Hyperkalzämie von Vitamin D selbst zu umgehen. Die Studie zeigte, dass ZK 156718 auf die Induktion der Differenzierung und auf die p21^{Waf1/Cip1}-Expression in CaCo-2 Zellen ebenso potent wirksam war, während die Wirkung auf die Hemmung des Zellwachstums und die Stimulierung der p27^{Kip1}-Expression im Vergleich zu Vitamin D noch deutlich effektiver war. Gleichzeitig konnte in *in vivo* Experimenten an Ratten nachgewiesen werden, dass ZK 156718 einen ca. 100-fach niedrigeren hyperkalzämischen Nebeneffekt zeigte als Vitamin D selbst [79].

1.3.7 Mitogen-aktivierte Proteinkinasen

Neben den Signalkaskaden, die beteiligt sind an der Antwort von Zellen auf Wachstumsfaktoren, Zytokine und umweltbedingten Stress, gibt es diejenigen, die die sogenannten MAPKs (Mitogen-aktivierte Proteinkinasen) - Familie von Kinasen aktivieren [81]. MAPKs sind eine Gruppe von Protein Serin/Threonin Kinasen, die aktiviert werden als Antwort auf eine Vielzahl von extrazellulären Stimuli [38]. MAPKs wurden erstmals identifiziert als Insulin-induzierende Proteinkinasen und es wurde gezeigt, dass diese Proteine reguliert werden über Tyrosin- und Threoninphosphorylierung gesteuert durch MEKs (MAPK upstream aktivierende Kinasen) [81].

MAPKs führen zur Induktion spezifischer zellulärer Effekte durch eine Signalübertragung im Zytoplasma bzw. aus dem Zytoplasma und/oder dem Zellkern. Dazu zählt unter anderem die Steuerung der Zellteilung, die Proliferation von Zellen, die Zelldifferenzierung sowie die Apoptose. Das Übertragungssystem funktioniert dabei über eine mehrfach in Serie geschaltete Kaskade von Phosphorylierungsschritten (Stimulus -> MAPKKK -> MAPKK -> MAPK). Ihre volle Aktivität erhalten MAPKs nach zweifacher Phosphorylierung z.B. an Threonin- sowie an Tyrosinresten, ihre Inaktivierung erfolgt durch MAP - Kinase Phosphatasen.

Man unterscheidet zwei Klassen von MAPKs: zum einen p42-44 (ERK; Extrazellulär Regulierte Kinase) MAPKs, die über Wachstumsfaktoren induziert werden und SAPKs (Stress-aktivierte Proteinkinasen), welche sowohl die p38 (reaktivierende Kinase) MAPKs einschließen, als auch die p46-54 JNKs (c-Jun NH₂-terminale Kinase), induzierbar durch Zytokine und zellulären Stress [67]. MAPKs spielen eine wesentliche Rolle in der Regulation der Zelldifferenzierung und der Zellproliferation. Hierzu wurde von Daniel et al. (2004) die Rolle der MAPK-Signalkaskade in der Butyrat-induzierten VDR-Expression und Differenzierung von Caco-2 Zellen untersucht (siehe Kap. 1.2.4.2). Mittels Western Blot erfolgte die Analyse der Phosphorylierung von p38 und mit Hilfe spezifischer Hemmstoffe von p38 (SB202190) und ERK1/2 (PD98059) konnten die MAPK-Signalwege weiter charakterisiert werden. Es wurde nachgewiesen, dass Butyrat über die Induktion der p38-MAPK die VDR-Expression steigert und dadurch die Zelldifferenzierung induziert, während der ERK1/2-Signalweg nicht beteiligt war. Es besteht somit eine Verbindung in der Signalübermittlung zwischen dem MAPK-Signalweg und der VDR-Expression in Caco-2 Zellen [38]. Von Schwab *et al.* (2006) wurde weiterhin nachgewiesen, dass Butyrat über den p38-MAPK vermittelten Signaltransduktionsweg eine Expression von PPAR γ bewirken kann, während auch hier der ERK1/2-Signalweg nicht beteiligt zu sein scheint. PPAR γ ist ein nuklearer Rezeptor, welcher an zahlreichen physiologischen Prozessen beteiligt ist, wie auch der Differenzierung von Zellen sowie der Insulin-Empfindlichkeit. Es wurde der spezifische p38-Inhibitor SB203580 und der spezifische ERK1/2-Inhibitor PD98059 verwendet [39]. Ebenso wurde in weiteren Studien nachgewiesen, dass Butyrat unter anderem über eine Aktivierung von p38 die Apoptose in humanen Kolonadenomzellen bewirken kann [82].

p38, dessen Aminosäuresequenz zu 48 % identisch ist mit der von ERK2 und zu 20-25 % mit einer Anzahl von anderen Proteinkinasen, ist nachweislich nicht nur an der Antwort auf Entzündungsprozesse beteiligt, sondern ebenso an Stress-induzierten Signalkaskaden, an der Zellproliferation und an der Apoptose [81].

1.4 Ziel der Arbeit

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, α -Liponsäure im Vergleich mit Butyrat, Valproat und Trichostatin A als Hemmstoff von Tumorzellwachstum und tumorinduzierter Angiogenese zu untersuchen. Während mehrere Studien die Wirkungen von Butyrat, Valproat und Trichostatin A als wirkungsvolle HDAC-Inhibitoren beschreiben, existieren für α -Liponsäure, als neu diskutierten HDAC-Inhibitor, bisher nur wenige Erkenntnisse.

Untersuchungen mit HDAC-Inhibitoren wurden an den verschiedensten Tumorzelllinien erfolgreich durchgeführt. Unsere Arbeitsgruppe hat an Kolonkarzinomzellen (CaCo-2 Zellen) einige bedeutende Ergebnisse erzielt. Das Pankreaskarzinom gilt noch immer als eine der häufigsten Krebstodesursachen. Kenntnisse um mögliche Therapien sind bis heute unvollständig.

Um zu erfahren, ob verschiedene HDAC-Inhibitoren, insbesondere α -Liponsäure, auch in Bezug auf das Pankreaskarzinom, auf Tumorwachstum und tumorinduzierte Angiogenese einwirken können, wurde die Pankreaskarzinomzelllinie MIA-PaCa-2 für die in dieser Arbeit durchgeführten Versuche gewählt.

Neben der direkten Wirkung von α -Liponsäure, Butyrat, Valproat und Trichostatin A auf Zellzahl und Proliferation der Tumorzellen, wurde die Produktion angiogener Faktoren unter Beteiligung des Vitamin-D-Rezeptors und des MAPK-Signaltransduktionsweg aufgezeigt.

2 MATERIAL UND METHODEN

2.1 Chemikalien und Lösungen

2.1.1 Allgemeine Chemikalien und Lösungen

Acrylamid, Bisacrylamid (37,5:1)	Applichem, Darmstadt
α -Liponsäure	Sigma, Deisenhofen
Ameisensäure, ca. 98%ig	Aldrich-Chemie, Steinheim
Aminosäuren, nicht-essentiell	Gibco, Eggenstein
Ammoniumperoxidsulfat (APS)	Merck, Darmstadt
Aqua ad inj.	Braun, Melsungen
Aqua bidest.	Braun, Melsungen
BioRad-Reagenz	BioRad, München
Bromphenolblau	Sigma, Deisenhofen
Buttersäure, Natriumsalz	Merck, Darmstadt
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck, Darmstadt
Dodecylsulfat, Natriumsalz (SDS)	ICN Biomedicals, Eschwege
1,4-Dithio-L-Threitol (DTT)	Boehringer, Mannheim
Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium (DMEM)	Gibco, Eggenstein
Ethylendiamintetraessigsäure-Dinatriumsalz-Dihydrat (EDTA)	Sigma, Deisenhofen
Essigsäure	Applichem, Darmstadt
Ethanol	Roth, Karlsruhe
Formaldehyd	Merck, Darmstadt
Gentamicin 5 μ g/ml	Sigma, Deisenhofen
Glycin	Roth, Karlsruhe

HCl	Merck, Darmstadt
Heparin Sodium	Sigma, Deisenhofen
HEPES	Sigma, Deisenhofen
Isopropanol	Merck, Darmstadt
Kälberserum, foetal (FCS)	Gibco, Eggenstein
Kristallviolett	Sigma, Deisenhofen
Methanol	Riedel-deHaen, Hannover
Magermilchpuler	Töpfer, Dietmannsried
NaCl	Merck, Darmstadt
NaOH	Merck, Darmstadt
PBS-Lösung	Gibco, Eggenstein
Penicillin-Streptomycin	Biochrom, Berlin
Ponceau-S-Lösung	Sigma, Deisenhofen
Probenpuffer Roti-Load 1	Roth, Karlsruhe
Proteaseinhibitor-Cocktail (Tabletten)	Boehringer, Mannheim
Precision Plus Protein™ Standards, Dual Color	BioRad, München
Pyruvat, Natriumsalz	Gibco, Eggenstein
Rinderserumalbumin	BioRad, München
Schwefelsäure	Appli Chem, Darmstadt
SuperSignal® Enhancer Solution	Pierce Biotechnology, Rockford, Illinois, USA
SuperSignal® Peroxide Solution	Pierce Biotechnology, Rockford, Illinois, USA
TEMED	Sigma, Deisenhofen
Trichostatin A	Sigma, Deisenhofen
Tris-Base	Amersham, Buckinghamshire, UK
Triton® X-100	Sigma, Deisenhofen
Trypanblau	Sigma, Deisenhofen
Trypsin-EDTA-Lösung	Biochrom, Berlin

Tween 29	Sigma, Deisenhofen
Valproat	Merck, Darmstadt
Zell-Lysispuffer	New England Biolabs, Beverly, Massachusetts, USA

2.1.2 Immunchemische Materialien

2.1.2.1 Antikörper

2.1.2.1.1 Erstantikörper

Alle verwendeten Antikörper sind gegen humane Antigene generiert.

anti- β -Actin, goat IgG, polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz California, USA
anti-HIF-1 α , mouse IgG, monoklonal	BD Biosciences, Heidelberg
anti-VEGF, mouse IgG, monoklonal	Oncogene, Darmstadt
anti-VDR, rabbit IgG, polyklonal	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz California, USA
anti-p38, rabbit IgG, polyklonal	Cell Signaling, Beverly Massachusetts, USA
anti-pp38, rabbit IgG, polyklonal	Cell Signaling, Beverly Massachusetts, USA

2.1.2.1.2 Zweitantikörper

goat-anti-mouse IgG	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz California, USA
goat-anti-rabbit IgG	Vector Laboratories, Peterborough Cambridgeshire, UK
horse-anti-goat IgG	Santa Cruz Biotechnology, Santa Cruz California, USA

2.1.2.2 Inhibitoren

SB 203580
Calbiochem, Vancouver
British Columbia, Canada

2.1.3 Kit-Systeme

Cyt Elisa™ Human VEGF
Cytimmune Sciences Inc, Rockville,
Maryland, USA

Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric)
Roche Diagnostics, Mannheim

Cytotoxicity Detection Kit (LDH)
Roche Diagnostics, Mannheim

Nuclear Extract Kit
Active Motif, Rixensart, Belgium

2.2 Arbeitsmaterialien und Geräte

2.2.1 Arbeitsmaterialien

Hypercassette™
Amersham, Buckinghamshire, UK

Hyperfilm™MP
Amersham, Buckinghamshire, UK

Filterpapier
Amersham Biosciences, Uppsala,
Schweden

Küvetten (10x10x45 mm)
Sarstedt, Nümbrecht

Lochplatten / Falcon® wells
Becton Dickinson, Le Pont De Claix,
Frankreich

Neubauer Zählkammer
Superior, Marienfeld

Nitrozellulose-Transfermembran
Schleicher & Schuell, Dassel

Pipetten
Corning Inc., Corning, New York, USA

Rührspatel
Sarstedt, Nümbrecht

Zellkulturflaschen
Nalge Nunc, Roskilde, Dänemark

Zellschaber
Nalge Nunc, Naperville, Illinois, USA

Zentrifugenröhrchen / Eppendorfcups	Eppendorf, Wesseling-Berzdorf
Zentrifugenröhrchen / Falcon® Tubes	Becton Dickinson, Le Pont De Claix, Frankreich

2.2.2 Geräte

Analysenwaage Sartorius, CP622-0CE	Sartorius Göttingen
CO ₂ -Brutschrank BB 6220	Heraeus, Hanau
CO ₂ -Brutschrank BB 16	Heraeus, Hanau
Desaga CabUVIS	Sarstedt, Wiesloch
Elektrophoresekammer Minigel Twin	Biometra, Göttingen
Elektrophoresesystem A2 Gator™ horizontal	OWL, Portsmouth, New Hampshire, USA
ELISA-Reader Spectra Rainbow	SLT Labinstruments, Crailsheim
ELISA-Waschautomat Columbus SLT M8/4R	SLT Labinsruments, Crailsheim
Entwicklerautomat Fuji FPM 800A	Fujifilm, Düsseldorf
Fluoreszenzmikroskop Axiovert 135	Zeiss, Jena
Graphitelektroden Nova Blot	Pharmacia Biotech, Freiburg
Magnetrührer IKAMAG RET	IKA-Labortechnik, Staufen
pH-Meter 766 Calimatic	Knick, Berlin
Präzisionswaage Basic GE-37	Sartorius, Göttingen
Schütteltisch IKA-Schüttler MTS 2	IKA-Labortechnik, Staufen
semi-dry-Blotter, EPS 301	Pharmacia Biotech, Freiburg
Spectrophotometer U-2000	Hitachi, Tokyo, Japan
Sterilbank Hera Safe 12/2	Heraeus, Hanau
Sterilbank LaminAir HB 2448	Heraeus, Hanau
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Ultraschall Sonoplus UW-70	Bandelin electronic, Berlin
Vortexer Reax 2000	Heidolph Instruments, Schwalbach
Wipptisch WT 16	Biometra, Göttingen

Zentrifuge Biofuge fresco 15R

Heraeus, Hanau

Zentrifuge Rotana TRC

Hettich, Tuttlingen

2.3 Die Zelllinie MIA-PaCa-2

Die MIA-PaCa-2 Zelllinie wurde 1977 von A.Yunis *et al.* an den Departments of Medicine and Biochemistry, University of Miami School of Medicine und dem Howard Hughes Medical Institute, Miami, Florida, USA etabliert. Die Zellen wurden aus dem Pankreastumorgewebe eines 65-jährigen kaukasischen Patienten isoliert und dienen seitdem in *in vitro* Studien weltweit als Untersuchungsmodell. Morphologisch handelt es sich um epithelähnliche Zellen, die ihren Ursprung in einem undifferenzierten, duktalem Pankreaskarzinom haben. MIA-PaCa-2 Zellen wachsen als Monolayer (Einzelzellschicht) bis zur Konfluenz. Ihre Verdopplungszeit beträgt ca. 40 Stunden [83]. **Abbildung 2.1** zeigt die mikroskopische Aufnahme eines subkonfluenten MIA-PaCa-2-Monolayers.

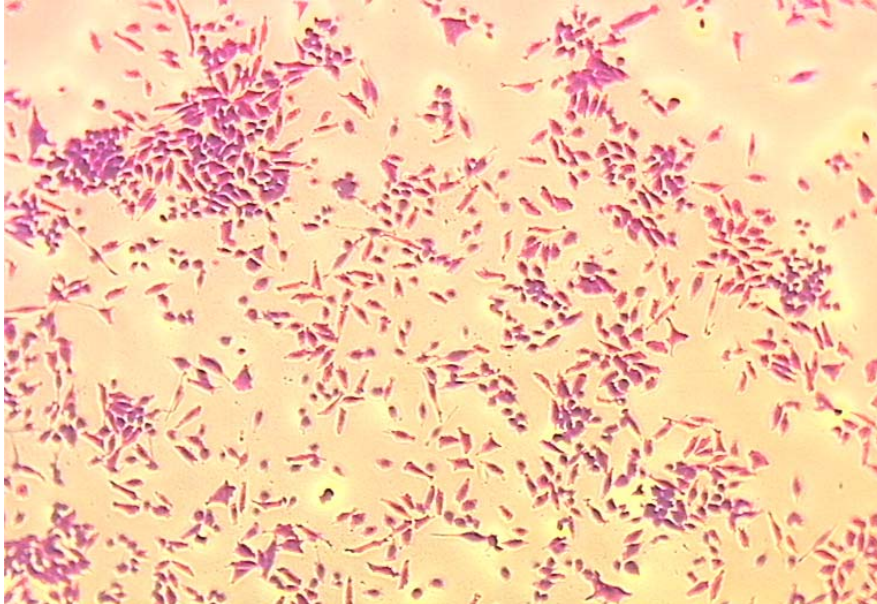


Abbildung 2.1 Subkonfluenten MIA-PaCa-2 Monolayer
(10-fache Vergrößerung, ungefärbt)

2.4 Zellkulturtechnik

Die MIA-PaCa-2 Zellen wurden vom European Collection of Cell Cultures (ECACC) bezogen. Für die Experimente wurden die Passagen 30-60 eingesetzt. Es erfolgten alle Arbeiten mit Zellkulturen unter sterilen Bedingungen (Lamin Air Flow).

2.4.1 Kultivierung der Zellen

Die MIA-PaCa-2 Zellen wurden in Polysterolzellkulturflaschen (175 cm²) im CO₂-Brutschrank bei 37°C und 100 % Luftfeuchtigkeit und einer konstanten CO₂-Zufuhr von 5 % kultiviert.

Als Nährmedium für die MIA-PaCa-2 Zellen wurde Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium (DMEM) verwendet. Diesem wurde 10 % [v/v] foetales Kälberserum (FCS), 100µg/ml Streptomycin, 100 E/ml Penicillin, 1 % [v/v] nicht-essentielle Aminosäuren und 1 % [v/v] Pyruvat zugesetzt. Es wurde alle zwei bis drei Tage mittels einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und durch 25 ml neues Medium ersetzt. Vor jedem Mediumwechsel wurden die Zellen mit einem Phasenkontrastmikroskop auf Entwicklung und eventuelle bakterielle und/oder mykologische Kontamination untersucht.

Die Zellen wurden regelmäßig einmal im Monat auf Mykoplasmenfreiheit getestet. Dazu wurde das VenorGeM®-Mykoplasmen-Diagnostikkit, zum Nachweis der am meisten verbreiteten Mykoplasmen/Acholeplasmen-Spezies in der Zellkultur (M.arginin, M.hyorhinois, M.laidlawii, M. orale) verwendet. Bei diesem Test handelt es sich um einen Nukleinsäure-Amplifikationstest auf Basis der Polymerase-Kettenreaktion. Mit dieser PCR (*polymerase chain reaction*) - Methode konnte sowohl eine sehr schnelle sowie sehr sensitive Detektion von Mykoplasmenkontamination in den biologischen Proben des Labors durchgeführt werden.

2.4.2 Passagieren der Zellen

Nachdem die Zellen eine 80-90 % Konfluenz erreichten, erfolgte regelmäßig die Subkultivierung. Dabei wurden die Zellen aus ihrem Monolayer gelöst, wodurch sie wieder in ein undifferenziertes Stadium übergangen, und standen erneut für die Bildung eines neuen Monolayers zur Verfügung.

Bei der Subkultivierung der MIA-PaCa-2 Zellen wurde das Nährmedium mittels Vakuumpumpe aus der Zellkulturflasche entfernt und die Zellen zweimal mit Dulbecco's Phosphat-gepufferter NaCl-Lösung (PBS aus 140 mM NaCl, 2,8 mM KCl, 8 mM Na₂HPO₄, 1,5 mM KH₂PO₄, ohne Calcium und Magnesium, in Aqua bidest., pH 7,4) gewaschen, um die Trypsininhibitoren des foetalen Kälberserums vollständig zu entfernen. Anschließend wurden 10 ml Trypsin-EDTA Lösung (aus PBS mit 0,25 % [w/v] Trypsin und 1 % [w/v] EDTA) zugegeben und die Zellen für 3-5 Minuten im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Die Ablösung der Zellen wurde dabei lichtmikroskopisch kontrolliert und meist durch vorsichtiges Klopfen gegen die Flaschenwand geringfügig beschleunigt. Nach vollständiger Ablösung der Zellen vom Flaschenboden und aus ihrem Verband wurde der Trypsinierungsprozess durch Zugabe von 10 ml Nährmedium unterbrochen. Die Zellsuspension wurde dann zum gleichmäßigen Suspensieren der Zellen mit einer Pipette mehrmals durchmischt und danach in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt. Um die Zellzahl der Zellsuspension zu bestimmen, wurden 80 µl abgenommen und mit 20 µl Trypanblau versetzt. Die vitalen Zellen dieses Gemischs wurden dann in einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt. Die Zellsuspension im Zentrifugenröhrchen wurde 10 Minuten bei 750 x g (1.500 upm) zentrifugiert, der Überstand anschließend abgesaugt und das Zellpellet am Boden des Zentrifugenröhrchens in frischem Nährmedium resuspendiert. Letztlich erfolgte die Aussaat der Zellen in gewünschter Verdünnung in neue Zellkulturflaschen oder in Lochplatten.

2.5 Zytotoxizitätstest

Anhand eines colorimetrischen Assays (Cytotoxicity Detection (LDH)) wurde die Zytotoxizität für α -Liponsäure in den verschiedenen Konzentrationen geprüft. In diesem Test wird das zytosolische Enzym Lactatdehydrogenase (LDH) nachgewiesen, das in allen Zellen vorhanden ist. LDH wird nach Zerstörung der Zellmembran in das Kulturmedium abgegeben und kann dann colorimetrisch nachgewiesen werden. Dieser Nachweis erfolgt durch die LDH-vermittelte Umwandlung von Laktat zu Pyruvat, wobei NAD⁺ zu NADH/H⁺ reduziert wird. Anschließend wird mit Hilfe eines Katalysators H/H⁺ vom NADH/H⁺ zum Tetrazoliumsalz INT transferiert, welches hierdurch zu Formazan reduziert wird. Die gebildete Formazanmenge korreliert somit mit der Anzahl der geschädigten Zellen, und eine gesteigerte Farbintensität im Zellüberstand deutet auf einen Anstieg der LDH-Aktivität hin. Eine 1 % Triton[®]X-100 Lösung, durch welche alle Zellen geschädigt werden, diente hierbei als Positivkontrolle.

Es wurden 5.000 bis 20.000 Zellen/well in 96-Lochplatten ausgesät und unter Standardbedingungen für 24 Stunden inkubiert. Danach wurden sie mit Medium und α -Liponsäure (gelöst in Ethanol) in den Konzentrationen 1mM/L, 3mM/L, 5mM/L und 10mM/L bzw. mit der Positivkontrolle (1 % Triton[®]X-100 Lösung) behandelt und nochmals für 2-24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde der Zellüberstand in neue 96-Lochplatten überführt und eine Reaktionslösung (Katalysator und Farblösung) hinzugegeben. Nach 30 Minuten lichtgeschützter Reaktionszeit wurde die Absorption im ELISA-Reader bei 492 nm gegen einen Referenzwert von 620 nm gemessen. Die Absorptionswerte wurden um die des jeweiligen Mediums bereinigt. Die Zytotoxizität wurde in Prozent der unbehandelten Kontrollzellen bzw. in Prozent der Positivkontrolle angegeben.

2.6 Zellzahlbestimmung mittels Kristallviolett

Die Bestimmung der Zellzahl nach Westergren-Thorsson *et al.* (1991) basiert auf folgendem Prinzip: Zellen, die mit Kristallviolett für bestimmte Zeit inkubiert werden, nehmen diesen Farbstoff in sich auf. Der Farbstoff Kristallviolett färbt dabei vorwiegend Nucleoproteine an. Nach der Auswaschung des ungebundenen Farbstoffs aus den Zellen ist die Farbintensität der Kristallviolettlösung proportional zur Zellzahl [84].

Hierfür wurden die MIA-PaCa-2 Zellen zunächst in 96-Lochplatten ausgesät und im CO₂-Brutschrank für 24 Stunden inkubiert. Anschließend wurde das Medium entfernt und die Zellen mit Standardmedium unter Zusatz der spezifischen Behandlungssubstanzen überschichtet. Nach Erreichen der gewünschten Inkubationszeiten wurde das Medium aus den Lochplatten entfernt und die Zellen mit 200 μ l/well 5 % Formaldehyd (Verdünnung von kommerziellem Formalin) in PBS für 5 Minuten fixiert, anschließend mit 200 μ l PBS/well gewaschen und dann mit 50 μ l/well 0,5 % Kristallviolettlösung in Aqua bidest. bedeckt. Nach 10 Minuten Inkubation wurden die Zellen erneut mit 200 μ l/well PBS dreimal gewaschen, danach die in den Zellen enthaltene Farbe mit 33 % Essigsäure in Aqua bidest. (100 μ l/well) herausgelöst und nach 5 Minuten Schütteln auf einem Schütteltisch bei einer Schüttelsequenz von 300/Minute die Absorption im ELISA-Reader ohne Referenzfilter bei 620 nm gemessen. Die Absorption korrelierte dabei mit der Anzahl der Zellen auf der Platte.

2.7 Bestimmung der Zellproliferation mittels BrdU-Test

Um die Proliferation der MIA-PaCa-2 Zellen zu bestimmen, wurde ein nicht-radioaktives Zellproliferations-Kit (BrdU-ELISA, Roche) verwendet. Das Prinzip dieses Tests beruht auf dem Einbau des Pyrimidinanalogons 5-Brom-2-Deoxyuridin (BrdU) anstatt von [³H]Thymidin in die DNA der proliferierenden Zellen. Nach diesem Einbau in die DNA kann das BrdU mittels Immunoassay detektiert werden.

Hierzu wurden die MIA-PaCas auf 96-Lochplatten ausgesät. Nach 24 Stunden Inkubation im CO₂-Brutschrank wurde das Zellkulturmedium entfernt und die Zellen mit den jeweiligen Testsubstanzen behandelt (100µl/well). Die Inkubationszeit hierfür betrug 24 und 48 Stunden. Anschließend wurden jeweils 10 µl BrdU labeling solution/well hinzugegeben und die Zellen unter Standardbedingungen erneut für 4 Stunden inkubiert. Während dieser „Labeling-Periode“ wurde das Pyrimidin-Analoga BrdU an Stelle des Thymins in die DNA der proliferierenden Zellen eingebaut. Anschließend erfolgte, nach Entfernen des Mediums, in einem Schritt die Fixierung der Zellen und die Denaturierung der DNA mittels Formaldehyd (FixDenat solution). Die Denaturierung der DNA war notwendig, um das eingebaute BrdU für die Antikörperdetektion zugänglich zu machen. Bei der anschließenden Behandlung mit Anti-BrdU-Peroxidase Lösung (Anti-BrdU-POD solution) wurde dieses an das eingebaute BrdU in der neu synthetisierten DNA gebunden. Der Immunkomplex wurde dann mittels Substratreaktion detektiert und das Reaktionsprodukt, nach 10 Sekunden schütteln, durch Absorptionsmessung im ELISA-Reader bei 450 nm (Referenzwellenlänge: 690 nm) quantifiziert. Die Farbentwicklung und die dadurch gemessene Absorption korrelierte mit der Menge der DNA-Synthese und somit mit der Zahl der proliferierenden Zellen.

2.8 Gewinnung von Zellkulturüberständen

Zur Gewinnung von MIA-PaCa-2 Zellkulturüberständen wurden die Zellen nach dem Auszählen in Zellkulturflaschen (175 cm²) in gleicher Dichte ausgesät. Bei 80-90 % Konfluenz wurde das Nährmedium abgesaugt und die Zellen zweimal mit je 10 ml PBS gewaschen. Nach Zugabe von FCS-freiem Medium und Zusatz bestimmter Behandlungssubstanzen wurden die Zellen für festgelegte Zeiten im Brutschrank inkubiert.

Danach wurden aus jeder Flasche 10 ml Medium abgenommen und diese sogenannten konditionierten Medien in Zentrifugenröhrchen (15 ml) für 5 Minuten bei 10.000 upm und 4°C zentrifugiert. Dadurch konnten abgelöste Zellen und Zellreste entfernt und die Überstände anschließend entnommen werden. Sie wurden in Eppendorf-Gefäße aliquotiert und bei -20°C gelagert.

2.9 ELISA – Enzyme-linked Immunosorbent Assay

Der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) basiert auf dem Prinzip eines sogenannten „Sandwich-ELISA“, wobei die Detektion des zu bestimmenden Proteins mit Hilfe zweier Antikörper erfolgt. Hierbei wird eine Probe unbekannter Antigenkonzentration mit einem gegen das zu bestimmende Antigen gerichteten spezifischen Antikörper versetzt, dem sogenannten „Erstantikörper“, der an ein Trägermaterial adsorbiert oder chemisch gekoppelt ist. Es folgt eine Inkubationsperiode, während der in der Probe enthaltenes Antigen spezifisch von diesem Erstantikörper gebunden wird. Der anschließende Waschvorgang dient dann dem Entfernen der frei in Lösung verbliebenen Antigene. Nach der Zugabe eines weiteren, mit einem Enzym markierten Antikörpers, dem sogenannten „Zweitantikörper“, kann dieser an das am Träger fixierte Antigen, dh. an die gebildeten Immunkomplexe, binden. Bei dem Enzym, mit welchem der Zweitantikörper markiert ist, handelt es sich um eine Peroxidase, die Merettich-Peroxidase, oder eine alkalische Phosphatase, die ein Substrat in ein farbiges Produkt umsetzt. Der überschüssige Zweitantikörper wird dann in einem weiteren Waschschrift entfernt und nach Zugabe des Substrats die Enzymaktivität kolorimetrisch oder photometrisch bestimmt. Die Stärke der Farbreaktion korreliert dabei direkt mit der Menge an Antigen in der Probe, die dann mittels Standardkurve quantitativ bestimmt werden kann.

Die Bestimmung der VEGF-Konzentration in den MIA-Pa-Ca-2 Zellkulturüberständen (siehe Kap. 2.8) wurde mit Hilfe des CytElisa™ Human VEGF Testkits (Cytimmune Sciences Inc, Maryland) entsprechend der Testanleitung durchgeführt. Zu Beginn wurden je 50 µl der zu untersuchenden Proben zusammen mit je 50 µl Assay Diluent in 96-well Platten pipettiert. Es wurden pro well 25 µl biotinylated rabbit anti-human VEGF polyclonal antibody zugefügt und die Platte anschließend bei Raumtemperatur für 3 Stunden inkubiert. Danach wurde die Platte fünfmal mit je 250 µl 1X Wash Buffer je well gewaschen. Nach Hinzufügen von je 50 µl Streptavidin Alkaline Phosphatase pro well folgte ein erneutes Inkubationsintervall von 45 Minuten. Anschließend erfolgte die Auswertung nach erneutem Waschen und der Zugabe der Color Reagent Solution photometrisch bei 490nm im ELISA-Reader.

2.10 Proteingewinnung

Zur Gewinnung der zellulären und nukleären Proteine sowie des Whole-Cell Extrakts wurde ein kommerziell erhältliches Extraktionskit (Nuclear Extract Kit) verwendet.

2.10.1 Gewinnung zellulärer Proteine

Die Gewinnung der Cytoplasma-Fraktion war von Bedeutung für einige in dieser Arbeit durchgeführten Western Blot Analysen (VEGF- und HIF-1 α - Proteinexpression). Dazu wurden die MIA-PaCa-2 Zellen zuerst in Zellkulturflaschen (80 cm³) in gleicher Dichte ausgesät. Nach Erreichen einer ca. 80 % Konfluenz wurden die Zellen nach Absaugen des Nährmediums zweimal mit PBS gewaschen. Anschließend wurden die spezifischen Behandlungssubstanzen in FCS-freiem Medium zugegeben und die Zellen im CO₂-Brutschrank inkubiert.

Nach dem Absaugen des alten Nährmediums nach Ablauf der Inkubation wurden die Zellen mit 5 ml eiskaltem PBS/Phosphatase Inhibitor je Flasche gewaschen und dann nach erneutem Absaugen 3 ml eiskalte PBS/Phosphatase Inhibitor-Lösung je Zellkulturflasche zugefügt. Anschließend wurden die Zellen vorsichtig mit einem Zellschaber vom Flaschenboden gelöst und in ein vorbereitetes 15 ml Reaktionsröhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde dann 5 Minuten lang in einer auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge bei 500 rpm zentrifugiert und der Überstand hinterher verworfen. Nach Resuspension des Zellpellets in 500 μ l 1X Hypotonic Buffer und Überführung in Eppendorf-Cups wurde die Zellsuspension für 15 Minuten auf Eis inkubiert. Danach wurde im Testkit enthaltenes Detergenz (25 μ l je Cup) zugefügt und schließlich 10 Sekunden im Schüttler vermischt. Nach einem weiteren Zentrifugationsschritt für 30 Sekunden bei 4°C und 14.000 x g konnte der Überstand, die cytoplasmatische Fraktion, in neue Eppendorf Cups überführt und nach der Proteinbestimmung bei -80°C tiefgefroren werden. Das verbliebene Zellpellet konnte später zur Gewinnung der nukleären Fraktion verwendet werden.

Je Zellkulturflasche verwendete Reagenzien:

- PBS/Phosphatase-Inhibitor:
 - 0,8 ml 10X PBS
 - 6,8 ml Aqua bidest.
 - 0,4 ml Phosphatase Inhibitor

- 1X Hypotonic Buffer:

50 µl 10X Hypotonic Buffer

450 µl Aqua bidest.

2.10.2 Gewinnung nukleärer Proteine

Für die Untersuchung der VDR-Proteinexpression war die Gewinnung nukleären Extrakts notwendig. Hierzu wurde das bei der Gewinnung der cytoplasmatischen Fraktion verbliebene Zellpellet (siehe Kap. 2.10.1) verwendet.

Zuerst wurden 50 µl Complete Lysis Buffer je Cup zur Resuspension des Zellpellets zugefügt und anschließend für 10 Sekunden gemixt (gevortext). Nach 30 Minuten Inkubation auf Eis auf einem Schütteltisch bei 150 rpm und erneuten 30 Sekunden „Vortexen“, wurde die Zellsuspension bei 14,000 x g und 4 °C für 10 Minuten zentrifugiert. Der dadurch gewonnene Überstand konnte als nukleäre Fraktion in Eppendorf-Cups aliquotiert und bis zur Proteinbestimmung bzw. bis zum Gebrauch bei -80 °C tiefgefroren werden.

Je Zellkulturflasche verwendete Reagenzien:

- Complete Lysis Buffer:

5 µl 10mM DTT

44,5 µl Lysis Buffer AM1

0,5 µl Protease Inhibitor Cocktail

2.10.3 Gewinnung von Whole-Cell Extrakt

Für alle weiteren in dieser Arbeit durchgeführten Western Blot Untersuchungen wurde Gesamthomogenat von MIA-PaCa-2 Zellen gewonnen. Erneut wurden die Zellen in gleicher Dichte ausgesät, bis zur ca. 80 % Konfluenz inkubiert und dann mit den spezifischen Substanzen behandelt. Nach Ablauf der gewünschten Inkubationszeiten wurde das Nährmedium abgezogen und die Zellen mit eiskaltem PBS/Phosphatase-Inhibitor (5 ml je Flasche) gewaschen.

Nach dem Entfernen wurden 3 ml PBS/Phosphatase-Inhibitor je Zellkulturflasche hinzugefügt, die Zellen dann vorsichtig mit einem Zellschaber vom Flaschenboden gelöst und die Zellsuspension in ein 15 ml Reaktionsröhrchen überführt. Anschließend wurde 5 Minuten bei 500 rpm in einer auf 4°C vorgekühlten Zentrifuge zentrifugiert und der verbliebene Überstand hinterher verworfen.

Das im Reaktionsröhrchen verbliebene Zellpellet wurde mit je 300 µl Complete Lysis Buffer resuspendiert und - nach 10 Sekunden „Vortexen“ - eisgekühlt für 10 Minuten bei 150 rpm auf einem Schütteltisch inkubiert. Danach wurde die Zellsuspension erneut 30 Sekunden gemixt und dann nochmals für 20 Minuten bei 14,000 x g in einer Kühlzentrifuge zentrifugiert (4°C). Der nun verbliebene Überstand konnte als Whole-Cell-Extract in Eppendorf-Cups pipettiert und bis zum Gebrauch bzw. zur Proteinbestimmung bei -80°C tiefgefroren werden.

Je Zellkulturflasche verwendete Reagenzien:

- PBS/Phosphatase Inhibitor (Kap. 2.10.1)

- Complete Lysis Buffer :
 - 30 µl 10 mM DTT
 - 267 µl Lysis Buffer
 - 3 µl Protease Inhibitor Cocktail

2.11 Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford

Die quantitative Proteinbestimmung basiert auf der Proteinbestimmungsmethode nach Bradford [85]. Sie erfolgte mit dem BioRad Protein Assay, bei dem der Farbstoff Coomassie Brilliant Blau G-25 verwendet wird. Bei Bindung dieses Farbstoffs an positiv geladene Proteine wird sein Absorptionsmaximum in einer sauren Lösung von 465 nm (protonierte braunrote kationische Form) nach 595 nm (unprotonierte blaue anionische Form) verschoben. Von den gewonnenen Probenüberständen (siehe Kap. 2.10) wurden hierzu jeweils 10 µl mit 2,5 ml BioRad Reagenz (BioRad Konzentrat 1:5 verdünnt mit H₂O) und 50 µl Ameisensäure (ca. 98 %) in einer Küvette mit einem Kunststoffspatel vermischt. Als Blindwert wurden 10 µl Aqua bidest. mit den gleichen Mengen BioRad Reagenz und Ameisensäure gemischt. Nach 5 Minuten konnte die Absorption bei 595 nm mit einem Spektralphotometer gegen den Blindwert gemessen werden. Die Proteinkonzentration wurde dann mit einer linearisierte Standardkurve bestimmt. Als Proteinstandard diente Rinderserumalbumin. Die Angabe der Proteinmenge erfolgte in mg Protein pro ml Lösung. Für spätere Proteinanalysen mittels Western Blot wurde der Rest der Überstände nach Proteinbestimmung mit PBS auf 7-50 µg Protein/µl verdünnt, zu je 10 µl aliquotiert und bei -80°C tiefgefroren.

2.12 Western Blot – Immunologischer Nachweis von Proteinen

Die Western Blot-Methode nach Towbin *et al.* (1979) dient dem immunologischen Nachweis spezifischer Proteine. Hierbei werden die in den Zellhomogenaten enthaltenen Proteine durch Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach ihrem Molekulargewicht elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Membran transferiert. An der Membranoberfläche bleiben sie aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften. Dabei bleibt das Muster der elektrophoretischen Auftrennung erhalten, die Proteine sind nun aber für weitere Methoden zugänglich und können dadurch mit spezifischen Antikörpern nachgewiesen werden. Eine Färbung mit Ponceau-S-Lösung bzw. die Bestimmung von β -Actin in den Proben dient der qualitativen und quantitativen Kontrolle des Proteintransfers. Die spezifischen Antikörper binden an der passenden Proteinbande auf der Membran. Unspezifisch gebundene Antikörper werden aufgrund von Waschschrritten wieder entfernt. Die Visualisierung erfolgt abschließend durch immunchemische Detektion mittels Chemilumineszenz; die Detektion der Signale durch Exposition eines Röntgenfilms [86].

2.12.1 SDS-Gelelektrophorese

Diese Methode basiert auf der SDS-PAGE nach Laemmli (1970), wobei die Proteinfraction einer Probe entsprechend ihrer negativen Ladung im elektrischen Feld aufgetrennt wird. Hierbei werden die zu untersuchenden Proteine mit einem Gel in Proteinbanden aufgetrennt [87].

Nach Gewinnung und Aufbereitung der Proben (siehe Kap. 2.8 und 2.10) wurden die Proteinlösungen mit Aqua bidest. verdünnt und im Verhältnis 3:1 mit dem Roti®-Load Probenpuffer vermischt, 3 Minuten bei 95°C unter Schütteln gekocht und schließlich - je nach Molekulargewicht des zu bestimmenden Proteins - auf ein 7,5-12,5%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Um die Proteine später identifizieren zu können, wurde pro Gel 10 μ l eines Molekulargewichtsmarkern (Precision Plus Protein™ Standards) aufgetragen. Nachdem das Gel in eine mit Laufpuffer gefüllte Elektrophoresekammer eingesetzt worden war, erfolgte die Elektrophorese für ca. 1 Stunde 15 Minuten bei 25 mA Stromfluss je Gel und maximal 300 V Stromstärke.

Für diese Gelelektrophorese wurden benötigt:

- Sammelgellösung für ein 5% Gel (2 ml/Gel):

0,33 ml 30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid Stammlösung

0,4 ml Tris/HCl (0,625 M/L), pH 6,8

0,4 ml SDS (0,5%)

2 µl TEMED

10 µl APS (10%)

in Aqua bidest.

- Trenngellösung (6 ml/Gel) für eine Acrylamidkonzentration von 7,5% (bzw. 12,5%):

1,5 ml (bzw. 2,5 ml) 30% Acrylamid 0,8% Bisacrylamid

1,2 ml Tris/HCl (1,88 M/L), pH 8,8

1,2 ml SDS (0,5%)

5 µl TEMED

30 µl APS (10%)

in Aqua bidest.

- Laufpuffer:

200 mM/L Glycin

25 mM/L Tris

1% ⇒ w/v ⇒ SDS

in Aqua bidest.

2.12.2 Proteintransfer auf Nitrozellulose

Durch das senkrecht zum Gel gerichtete elektrische Feld wandern die Proteine aus dem Gel auf eine Membran. Der Transfer der Proteine auf die mit Blot-Puffer getränkte Nitrozellulosemembran erfolgte mittels einer „semi-dry“-Blotapparatur bei 55 mA pro Gel und 300 V für durchschnittlich 1 Stunde 15 Minuten. Dabei wanderten die sich im Gel befindlichen Proteine in Richtung Anode. Anschließend wurde die Membran für ca. 2 Minuten mit Ponceau-S-Färbelösung inkubiert, um den Erfolg der Proteinübertragung zu kontrollieren. Nach mehrmaligem Waschen mit TBS-T-Lösung war die Nitrozellulosemembran wieder entfärbt.

Für diesen Proteintransfer wurden verwendet:

- Blot-Puffer, pH 8,3:

50mM/L Tris

40 mM/L Glycin

20% \Rightarrow v/v \Rightarrow Methanol

0,0375% \Rightarrow w/v \Rightarrow SDS

in Aqua bidest.

- Ponceau-S-Färbelösung:

0,1% \Rightarrow w/v \Rightarrow Ponceau-S

5% \Rightarrow v/v \Rightarrow Essigsäure

in Aqua bidest.

- TBS-T:

10% \Rightarrow v/v \Rightarrow TBS (konz.)

0,05% \Rightarrow v/v \Rightarrow Tween-20

in Aqua bidest.

- TBS (konz.) / Tris-Puffer:

1,0 M/L NaCl

0,1 M/L Tris-Base

in Aqua bidest., pH 7,5

2.12.3 Immunchemische Detektion mittels Chemilumineszenz

Nach dem Proteintransfer wurde die Nitrozellulosemembran für 60 Minuten bei Raumtemperatur auf einem Schütteltisch oder über Nacht bei 4°C in Blockpuffer inkubiert, um die unspezifischen Proteinbindungsstellen zu blockieren. Danach wurde die Membran mit TBS-T dreimal für je 5 Minuten gewaschen und anschließend mit dem spezifischen Erstantikörper - in 8 ml Blockpuffer gelöst - 60 Minuten lang bei Raumtemperatur auf dem Schütteltisch oder über Nacht bei 4°C im Kühlschrank inkubiert. Nach drei weiteren Waschschrritten mit TBS-T zur Entfernung des nun noch ungebundenen Antikörpers, folgte eine erneute Inkubation mit einem Peroxidase-konjugiertem Zweitantikörper (HRP=horse radish peroxidase). Dieser wurde ebenfalls in 8 ml Blockpuffer gelöst und für 30 Minuten auf dem Schütteltisch bei Raumtemperatur auf der Membran belassen.

Nach erneutem Waschen mit TBS-T (3 x 10 Minuten), wodurch die unspezifisch angelagerten Liganden entfernt wurden, folgte die Detektion mittels Chemilumineszenz: Nach Vermischen der SuperSignal®Enhancer Solution und der SuperSignal®Peroxide Solution im Verhältnis 1:1, wurde diese für 5 Minuten auf die Membran gegeben. Mit einem Röntgenfilm (Hyperfilm™MP) wurde die durch die Merettichperoxidase katalysierte Lichtreaktion (Oxidationsreaktion mit anschließender Lichtemission) dargestellt. Der Film wurde je nach Signalstärke und Hintergrund zwischen 1 Sekunde und 20 Minuten exponiert und dann entwickelt. Analog wurde β -Actin als quantitative Kontrolle anschließend in den Proben bestimmt.

Für die Immunchemische Detektion wurden verwendet:

- Erstantikörper:

β -Actin: anti- β -Actin, goat IgG, polyklonal, 200 μ g/ml
Endkonzentration: 1:2000 in Blockpuffer

HIF-1 α : anti-HIF-1 α , mouse IgG, monoklonal, 250 μ g/ml
Endkonzentration: 1:250 in Blockpuffer

VEGF (Ab-3): anti-VEGF, mouse IgG, monoklonal, 100 μ g/ml
Endkonzentration: 1:200 in Blockpuffer

VDR: anti-VDR, rabbit IgG, polyklonal, 200 μ g/ml
Endkonzentration: 1:1000 in Blockpuffer

p38: anti-p38, rabbit IgG, polyklonal, 5 μ g/ml
Endkonzentration: 1:1000 in Blockpuffer

pp38: anti-pp38, rabbit IgG, polyklonal, 40 μ g/ml
Endkonzentration 1:1000 in Blockpuffer

- Zweitantikörper:

anti-goat IgG: IgG-HRP-konjugiert, 200 μ g/0,5 ml
Endkonzentration: 1:2000 in Blockpuffer

anti-mouse IgG: IgG-HRP-konjugiert, 200 µg/0,5 ml
Endkonzentration: 1:2000 in Blockpuffer

anti-rabbit IgG: IgG-HRP-konjugiert, 200 µg/0,5 ml
Endkonzentration: 1:2000 in Blockpuffer

- Inhibitor:

SB203580: p38-Inhibitor, [20 µM/L], gelöst in DMSO

- Blockpuffer:

3% ⇒ w/v ⇒ Magermilchpulver
in TBS-T

2.13 Statistische Auswertung

Alle in dieser Arbeit aufgeführten Ergebnisse sind als Mittelwerte (MV, mean value) ± Standardabweichung des Mittelwertes (standard error of the mean, SEM) einer bestimmten Anzahl von Experimenten (n) angegeben. Die Berechnung statistisch signifikanter Unterschiede (mindestens *p<0,05: signifikant; mindestens **p<0,01, ***p<0,001: hoch signifikant) wurde mit dem paired t-Test (SigmaPlot) durchgeführt.

3 ERGEBNISSE

Dieser Teil der Arbeit dient der Darstellung und Erläuterung der Versuchsergebnisse. Zum einen wird gezeigt wie die Histondeacetylase - Inhibitoren α -Liponsäure, Butyrat, Valproat und Trichostatin A die Zellzahl und die Proliferation der hier verwendeten Pankreaskarzinomzelllinie MIA-PaCa-2 beeinflussen. Weiterhin wird die Wirkung dieser HDAC-Inhibitoren auf die Sekretion des Wachstumsfaktors VEGF und der Einfluss von α -Liponsäure im Vergleich zu Butyrat auf die Expression dieses Wachstumsfaktors dargestellt. Im dritten Teil der Arbeit werden Mechanismen untersucht, die der Regulation dieser Faktoren zugrunde liegen könnten. Hierbei wird auf die Expression von HIF-1 α sowie den p38-MAPK-Signaltransduktionsweg eingegangen.

3.1 Zytotoxizität von α -Liponsäure

Zu Beginn der Versuchsreihe wurde die Zytotoxizität von α -Liponsäure in steigenden Konzentrationen von (1, 3, 5 und 10mM/L) mittels LDH-Kit untersucht. Die in dieser Arbeit verwendeten Konzentrationen von α -Liponsäure (1, 2 und 5mM/L) konnten als nicht toxisch bewertet werden (**siehe Abbildung 3.1**). Die in den nachfolgenden Versuchen beobachteten Effekte sind somit nicht auf die Toxizität von α -Liponsäure zurückzuführen.

Eine Behandlung mit α -Liponsäure (10mM/L) wies eine 24,5 % Toxizität auf und wurde aus diesem Grund in den Versuchen nicht eingesetzt.

Eine mögliche zytotoxische Wirkung von Butyrat, Valproat und TSA wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits im Vorfeld für verschiedene Pankreaskarzinomzelllinien ausgeschlossen.

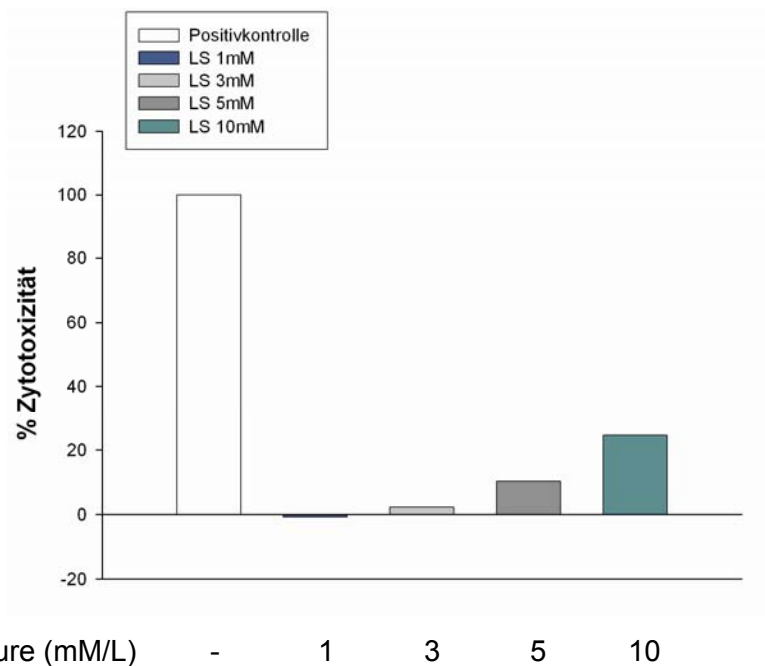


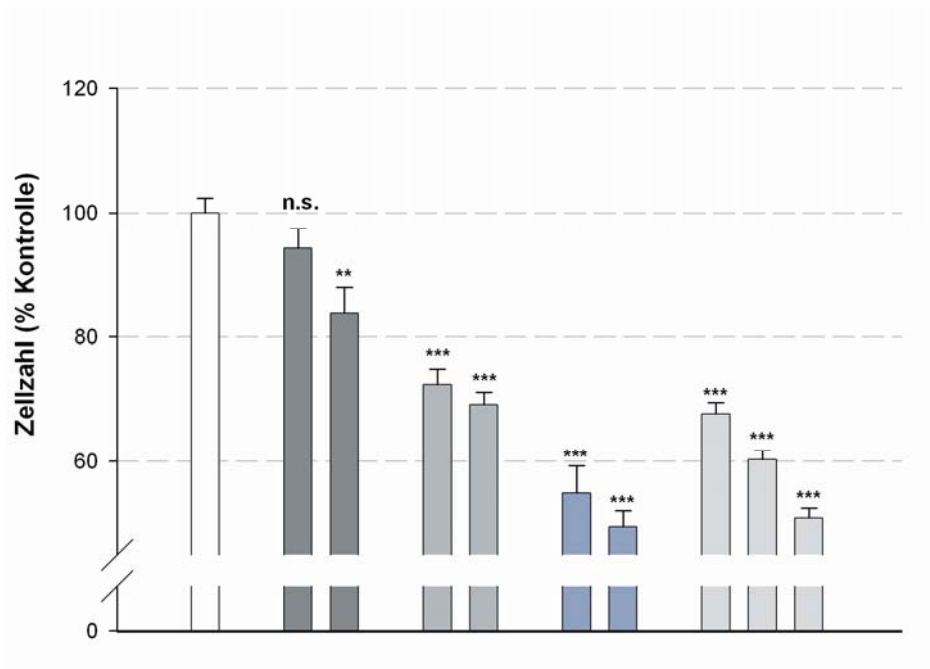
Abbildung 3.1 Darstellung des Zytotoxizitätstests für α -Liponsäure in Konzentrationen von (1-10mM/L) im Vergleich zur Positivkontrolle (Triton[®]X-100)

3.2 Zellzahl von MIA-PaCa-2

Um das Wachstum eines Tumors zu hemmen, spielt der Einfluss einer Behandlungssubstanz auf die Zellzahl eine entscheidende Rolle. Die Zellzahl wurde, wie in Kap. 2.6 beschrieben, mittels Kristallviolett färbung bestimmt. Die wachstumshemmenden Effekte der in diesen Versuchen verwendeten HDAC-Inhibitoren auf MIA-PaCa-2 Zellen wurden in verschiedenen Versuchen zeit- und dosisabhängig untersucht.

Dazu wurden subkonfluente, in Zellkultur gezüchtete humane MIA-PaCa-2 Zellen mit α -Liponsäure -, Butyrat -, Valproat- oder Trichostatin A - supplementiertem Medium in verschiedenen Konzentrationen, und im Vergleich dazu mit Standardkulturmedium als Kontrolle, inkubiert. Zu verschiedenen Zeitpunkten (nach 24 und 48 Stunden Inkubationsdauer) wurde die Zellzahl von MIA-PaCa-2 (siehe Kap. 2.6) bestimmt.

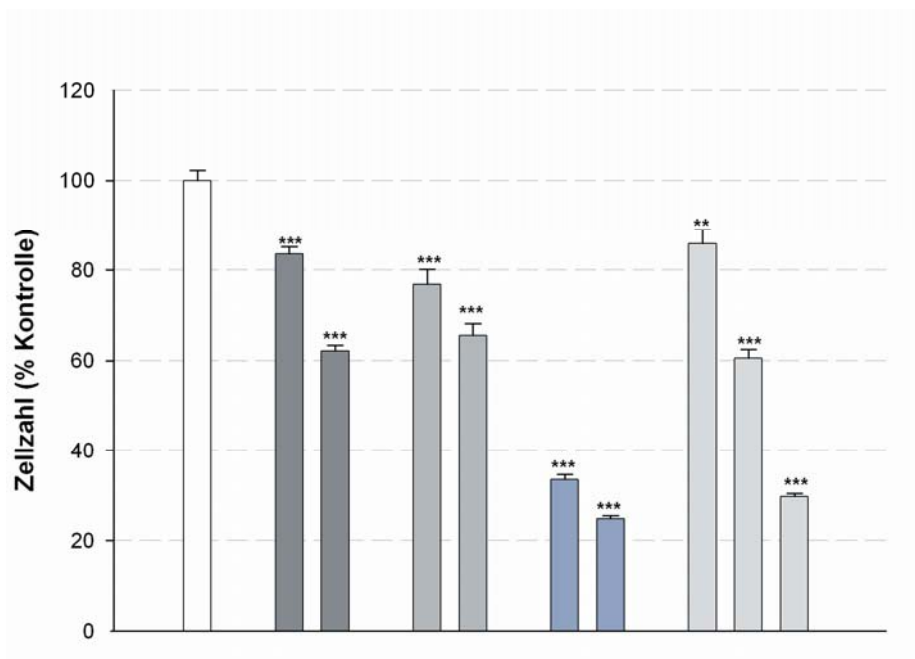
Wie in **Abbildung 3.2a** und **Abbildung 3.2b** erkennbar, reagierten MIA-PaCa-2 Zellen mit einer signifikanten Abnahme der Zellzahl nach Behandlung mit allen HDAC-Inhibitoren. Das Ausmaß der Hemmung ihrer mitogenen Aktivität nahm mit zunehmender Konzentration der jeweiligen Behandlungssubstanzen zu.



Butyrat (mM/L)	1	2	-	-	-	-	-	-
Valproat (mM/L)	-	-	1	2	-	-	-	-
Trichostatin A (nM/L)	-	-	-	-	100	400	-	-
α -Liponsäure (mM/L)	-	-	-	-	-	-	1	2
								5

Abbildung 3.2a Zellzahl von MIA-PaCa-2 Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Butyrat in den Konzentrationen (1 bzw. 2mM/L), Valproat in den Konzentrationen (1 bzw. 2mM/L), Trichostatin A in den Konzentrationen (100 bzw. 400nM/L), α -Liponsäure in den Konzentrationen (1, 2 bzw. 5mM/L). Die Ergebnisse sind in Prozent der jeweiligen Kontrolle, die auf 100 % gesetzt wurde, angegeben. Mittelwerte \pm S.E., n=6. n.s.=nicht signifikant. **p<0,01. ***p<0,001 vs. Kontrolle.

Wie in **Abbildung 3.2a** erkennbar, führte eine Inkubation der MIA-PaCa-2 Zellen nach Behandlung mit nahezu allen HDAC-Inhibitoren zu einer hochsignifikanten ($p < 0,001$) Abnahme der Zellzahl im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. Einzig die Behandlung mit Butyrat in niedriger Konzentration von (1mM/L) induzierte eine nicht-signifikante Abnahme der MIA-PaCa-2 Zellen (auf 94 %) während eine Inkubation mit Butyrat (2mM/L) die Zellzahl signifikant ($p < 0,01$) reduzierte (84 %). Die 24-stündige Inkubation mit Valproat führte zur Abnahme der Zellzahl auf 72 % (VPA 1mM/L) bzw. 69 % (VPA 2mM/L). Die deutlichste Hemmung auf die Zahl der MIA-PaCa-2 Zellen zeigte Trichostatin A. TSA (100nM/L) senkte die Zellzahl auf 55 % und die Behandlung mit TSA (400nM/L) auf 49 %. α -Liponsäure reduzierte die Anzahl der MIA-PaCa-2 Zellen am stärksten in einer Konzentration von (5mM/L) auf 51 %. Eine deutliche Abnahme zeigte sich aber auch nach Inkubation mit α -Liponsäure (1mM/L) auf 68 % und (2mM/L) auf 60 %.

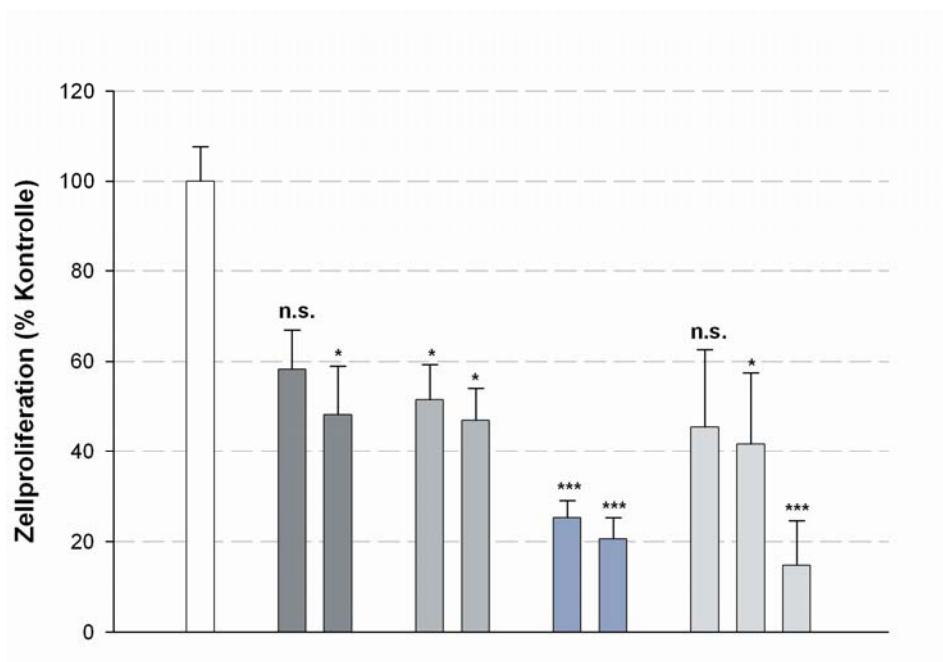


Butyrat (mM/L)	1	2	-	-	-	-	-	-
Valproat (mM/L)	-	-	1	2	-	-	-	-
Trichostatin A (nM/L)	-	-	-	-	100	400	-	-
α-Liponsäure (mM/L)	-	-	-	-	-	-	1	2
							5	

Abbildung 3.2b Zellzahl von MIA-PaCa-2 Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit Butyrat in den Konzentrationen (1 bzw. 2mM/L), Valproat in den Konzentrationen (1 bzw. 2mM/L), Trichostatin A in den Konzentrationen (100 bzw. 400nM/L), α-Liponsäure in den Konzentrationen (1, 2 bzw. 5mM/L). Die Ergebnisse sind in Prozent der jeweiligen Kontrolle, die auf 100 % gesetzt wurde angegeben. Mittelwerte ± S.E., n=6. **p<0,01. ***p<0,001 vs. Kontrolle.

Nach 48-stündiger Inkubation von MIA-PaCa-2 Zellen zeigte sich für alle Behandlungssubstanzen mit zunehmenden Konzentrationen eine signifikante bzw. hochsignifikante ($p < 0,01$ und $p < 0,001$) Abnahme der Zellzahlrate im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. **Abbildung 3.2b** zeigte eine Reduktion der Zellzahl nach Behandlung mit Butyrat (1mM/L) nach 48 Stunden auf 84 % der Kontrolle. Eine stärkere Abnahme der Zellzahl zeigte sich bei Behandlung mit Butyrat (2mM/L) konditioniertem Medium (auf 62 %). Nach 24 Stunden Inkubation gewonnenes, mit Valproat (1mM/L) konditioniertes Medium reduzierte die Zellzahl auf 77 % im Vergleich zur Kontrolle während der mit Valproat (2mM/L) entnommene Zellkulturüberstand diese auf 66 % weiter reduzierte. Die stärkste Hemmung konnte nach Behandlung mit Trichostatin A festgestellt werden. TSA (100nM/L) reduzierte die Zellzahl auf 33 %, TSA (400nM/L) auf 25 % der Kontrolle. α-Liponsäure konditioniertes Medium führte nach 48 Stunden Behandlung zu einer Abnahme der Zellzahlrate: α-Liponsäure (1mM/L) auf 86 %, α-Liponsäure (2mM/L) auf 61 %, α-Liponsäure (5mM/L) auf 30 %.

3.3 Zellproliferation von MIA-PaCa-2

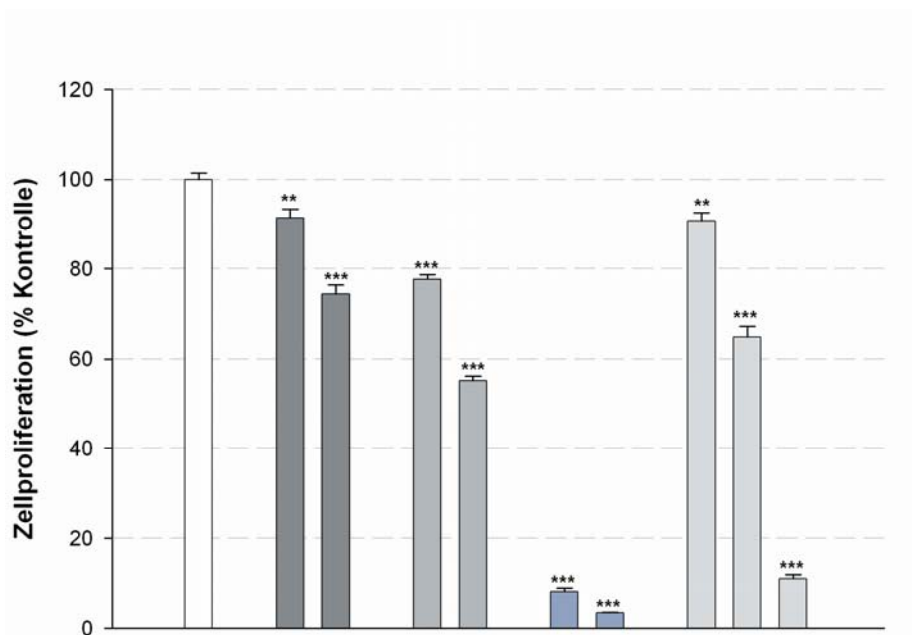


Butyrat (mM/L)	1	2	-	-	-	-	-	-
Valproat (mM/L)	-	-	1	2	-	-	-	-
Trichostatin A (nM/L)	-	-	-	-	100	400	-	-
α-Liponsäure (mM/L)	-	-	-	-	-	-	1	2 5

Abbildung 3.3a Zellproliferation von MIA-PaCa-2 Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Butyrat in den Konzentrationen (1 bzw. 2mM/L), Valproat in den Konzentrationen von (1 bzw. 2 mM/L), Trichostatin A in den Konzentrationen von (100 bzw. 400nM/L), α-Liponsäure in den Konzentrationen von (1, 2 bzw. 5mM/L). Die Ergebnisse sind in Prozent der jeweiligen Kontrolle die auf 100 % gesetzt wurde, angegeben. Mittelwerte ± S.E., n=6. n.s.=nicht signifikant. *p<0,05. ***p<0,001 vs. Kontrolle.

Neben dem Einfluss auf die Zellzahl ist die Wirkung der verschiedenen HDAC-Inhibitoren auf die Proliferationsfähigkeit der Pankreaskarzinomzellen sowohl für das Tumorstadium wie auch für den Angiogeneseprozess von Bedeutung (siehe Kap. 1.3.1 und 1.3.3.2).

Hierzu wurden subkonfluente MIA-PaCa-2 Zellen über 24 bzw. 48 Stunden mit Butyrat (1mM/L, 2mM/L) -, Valproat (1mM/L, 2mM/L) -, TSA (100nM/L, 400nM/L) - und α-Liponsäure (1 - 5mM/L) – supplementiertem Medium im Vergleich zu einer unbehandelten Kontrolle unter Standardbedingungen inkubiert und anschließend die Zellproliferation nach 24 und 48 Stunden mittels Zellproliferationskit (BrdU-ELISA) (siehe Kap. 2.7) bestimmt.



Butyrat (mM/L)	1	2	-	-	-	-	-	-	-
Valproat (mM/L)	-	-	1	2	-	-	-	-	-
Trichostatin A (nM/L)	-	-	-	-	100	400	-	-	-
α -Liponsäure (mM/L)	-	-	-	-	-	-	1	2	5

Abbildung 3.3b Zellproliferation von MIA-PaCa-2 Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit Butyrat in den Konzentrationen von (1 bzw. 2mM/L), Valproat in den Konzentrationen von (1 bzw. 2mM/L), Trichostatin A in den Konzentrationen von (100 bzw. 400 nM/L), α -Liponsäure in den Konzentrationen von (1, 2 bzw. 5 mM/L). Die Ergebnisse sind in Prozent der jeweiligen Kontrolle die auf 100 % gesetzt wurde, angegeben. Mittelwerte \pm S.E., n=6. **p<0,01. ***p<0,001 vs. Kontrolle.

Wie aus **Abbildung 3.3a und 3.3b** ersichtlich, führte die Inkubation mit allen konditionierten MIA-PaCa-2 Medien mit zunehmender Konzentration zu einer Abnahme der Proliferationsrate. Sowohl nach 24 als auch nach 48 Stunden hatte Trichostatin A die stärkste Wirkung auf die Hemmung der Proliferationsfähigkeit der Zellen. TSA (100nM/L) reduzierte die Zellproliferation nach 24 Stunden auf 29 % und nach 48 Stunden auf 8 %; TSA (400nM/L) führte zur Abnahme auf 21 % (24 Stunden) bzw. auf 3 % (48 Stunden). Aber auch die Behandlung mit α -Liponsäure zeigte eine deutlich hemmende Tendenz auf den Einbau von BrdU in MIA-PaCa-2 Zellen. Vor allem eine Inkubation mit α -Liponsäure (5mM/L) reduzierte die Proliferationsrate hochsignifikant auf 16 % (24 Stunden) bzw. 11 % (48 Stunden). Nach 24 Stunden Inkubation mit α -Liponsäure (1mM/L) war eine Hemmung auf 46 %, nach 48 Stunden jedoch lediglich auf 91 % erkennbar. α -Liponsäure (2mM/L) führte zur Reduktion auf 41 % nach 24-stündiger und auf 65 % nach 48-stündiger Behandlung. Die Proliferation der MIA-PaCa-2 Zellen, die mit Butyrat (1mM/L, 2mM/L) und

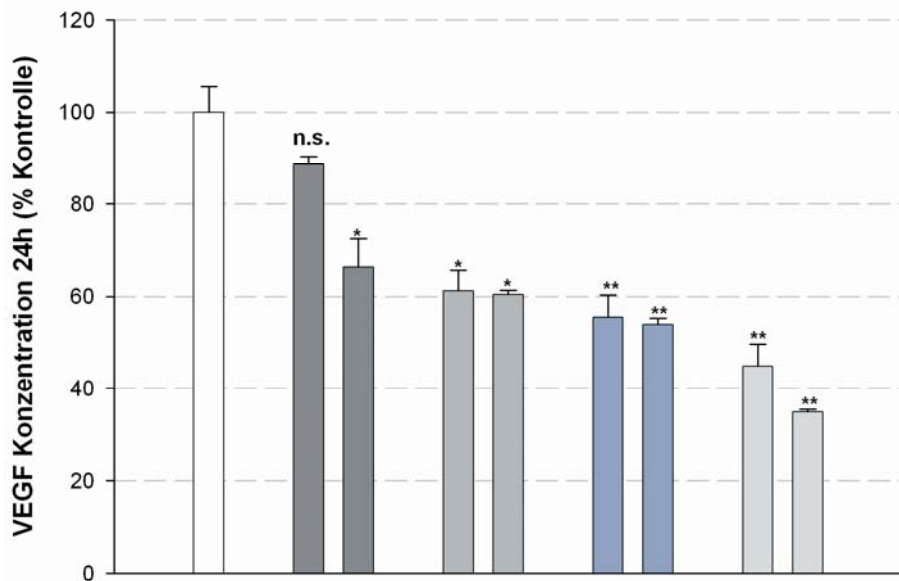
Valproat (1mM/L, 2mM/L) behandelt wurden, sank ebenfalls mit zunehmender Konzentration, wobei Valproat stärker wirksam war und die Proliferationshemmung nach 24 Stunden intensiver als nach 48 Stunden zu beobachten war: (Butyrat (1mM/L) auf 59 % nach 24 Stunden und auf 91 % nach 48 Stunden; Butyrat (2mM/L) auf 44 % nach 24 Stunden und auf 74 % nach 48 Stunden; Valproat (1mM/L) auf 54 % nach 24 Stunden und auf 78 % nach 48 Stunden; Valproat (2mM/L) auf 49 % nach 24 Stunden und auf 55 % nach 48 Stunden).

3.4 Einfluss von HDAC-Inhibitoren auf die Synthese von VEGF in MIA-PaCa-2 Zellen

Wie in Kapitel 1.3.3.1 und 1.3.4 beschrieben ist der *vascular endothelial growth factor* ein grundlegender Faktor für den physiologischen und auch pathologischen Angiogeneseprozess. Im Rahmen der Tumorentwicklung führt VEGF als proangiogenetischer Faktor zum *Angiogenic Switch*. Er wird von Tumorzellen sowohl exprimiert als auch sezerniert und ist somit maßgeblich an Tumorwachstum und Metastasierung beteiligt.

3.4.1 Sekretion von VEGF

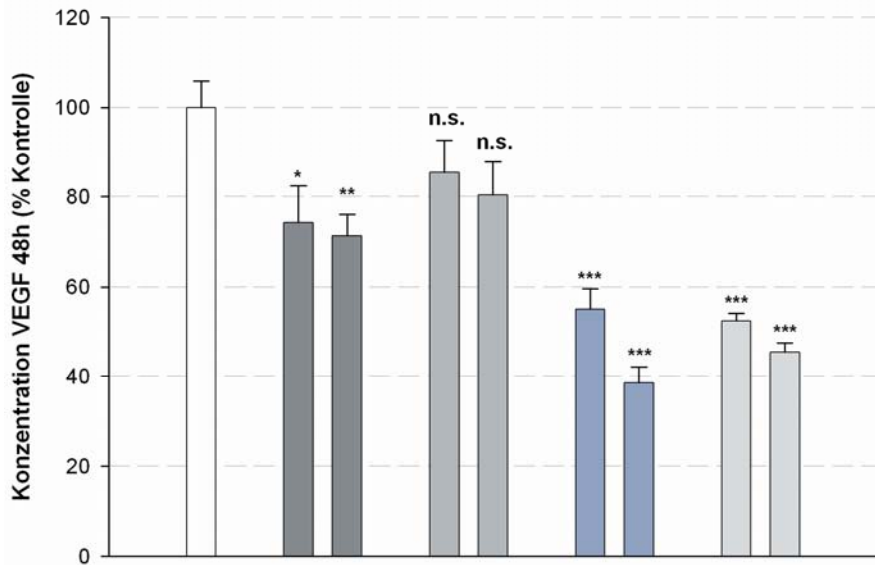
Zunächst wurde der Einfluss der verschiedenen HDAC-Inhibitoren auf die Sekretion von VEGF in MIA-PaCa-2 Zellen untersucht. Hierzu wurden subkonfluente MIA-PaCa-2 Zellen mit Standardmedium bzw. Medium supplementiert mit α -Liponsäure (1mM/L, 2mM/L) , Butyrat (1mM/L, 2mM/L), Valproat (1mM/L, 2mM/L), Trichostatin A (100nM/L, 400nM/L) und α -Liponsäure (1mM/L, 2mM/L) inkubiert. Die VEGF-Sekretion wurde mittels ELISA in den Zellkulturüberständen nach einer Inkubationsdauer von 24 und 48h bestimmt (**Abbildung 3.4a und 3.4b**).



Butyrat (mM/L)	1	2	-	-	-	-	-	-
Valproat (mM/L)	-	-	1	2	-	-	-	-
Trichostatin A (nM/L)	-	-	-	-	100	400	-	-
α-Liponsäure (mM/L)	-	-	-	-	-	-	1	2

Abbildung 3.4a Sekretion von VEGF in MIA-PaCa-2 Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Butyrat in den Konzentrationen von (1 bzw. 2mM/L), Valproat in den Konzentrationen von (1 bzw. 2mM/L), Trichostatin A in den Konzentrationen von (100 bzw. 400nM/L), α-Liponsäure in den Konzentrationen von (1 bzw. 2mM/L). Die Ergebnisse sind in Prozent der jeweiligen Kontrolle, die auf 100 % gesetzt wurde, angegeben. Mittelwerte ± S.E., n=6. n.s.=nicht signifikant. *p<0,05. **p<0,01 vs. Kontrolle.

Nach 24 Stunden entnommener Zellkulturüberstand reduzierte die Sekretion von VEGF in den Pankreaskarzinomzellen nach Inkubation mit allen Behandlungssubstanzen. Butyrat (1mM/L) minderte die Sekretion nicht-signifikant auf 88,6 % im Vergleich zur Kontrolle. Eine stärkere Abnahme der Sekretion auf 66 % zeigte sich nach Behandlung mit Butyrat (2mM/L). Valproat konditioniertes Medium (1mM/L) bzw. (2mM/L) führte zur signifikanten Reduktion der VEGF-Sekretion auf 61 % bzw. 60 % der Kontrolle. Mit Trichostatin A (100nM/L) konditioniertes Medium bewirkte eine signifikante Abnahme des Einbaus von BrdU auf 55 %, Trichostatin A (400nM/L) konditioniertes Medium auf 54 %. Signifikante Resultate wurden auch nach Behandlung mit α-Liponsäure beobachtet, das nach 24 Stunden die stärkste Hemmung der VEGF-Sekretion zeigte (α-Liponsäure (1mM/L) : auf 45 %, α-Liponsäure (2mM/L) : auf 35 % der Kontrolle).



Butyrat (mM/L)	1	2	-	-	-	-	-	-
Valproat (mM/L)	-	-	1	2	-	-	-	-
Trichostatin A (nM/L)	-	-	-	-	100	400	-	-
α -Liponsäure (mM/L)	-	-	-	-	-	-	1	2

Abbildung 3.4b Sekretion von VEGF in MIA-PaCa-2 Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit Butyrat in den Konzentrationen von (1 bzw. 2mM/L), Valproat in den Konzentrationen (1 bzw. 2mM/L), Trichostatin A in den Konzentrationen von (100 bzw. 400nM/L), α -Liponsäure in den Konzentrationen von (1 bzw. 2mM/L). Die Ergebnisse sind in Prozent der jeweiligen Kontrolle, die auf 100 % gesetzt wurde, angegeben. Mittelwerte \pm S.E., n=6. n.s.=nicht signifikant. *p<0,05. **p<0,01. ***p<0,001 vs. Kontrolle.

Wie in **Abbildung 3.4b** erkennbar, führte die Inkubation mit allen verwendeten Behandlungssubstanzen zu einer Abnahme der VEGF Sekretion. Diese war mit zunehmenden Konzentrationen der Behandlungssubstanzen stärker. Die deutlichsten Resultate wurden nach 48 Stunden mit Trichostatin A erzielt. TSA (100nM/L) reduzierte die Sekretion von VEGF hochsignifikant auf 55 %, TSA (400nM/L) führte zur hochsignifikanten Reduktion auf 39 % der Kontrollwerte. Hochsignifikante aussagekräftige Ergebnisse konnten auch nach Behandlung mit α -Liponsäure beobachtet werden. α -Liponsäure (1mM/L) reduzierte die VEGF Sekretion in MIA-PaCa-2 Zellen auf 52 % und α -Liponsäure (2mM/L) auf 45 % im Vergleich zur Kontrolle. Butyrat führte in beiden Konzentrationen zu einer signifikanten Hemmung von VEGF (Butyrat (1mM/L) : 74 %, Butyrat (2mM/L) : 71 %). Durch Inkubation mit Valproat (1mM/L) kam es zur Abnahme auf 85 %, Valproat (2mM/L) reduzierte auf 80 %. In beiden Konzentrationen war die Hemmung der VEGF Sekretion nicht-signifikant.

3.4.2 Proteinexpression von VEGF nach Behandlung mit α -Liponsäure und Butyrat

Nachdem durch die verschiedenen Behandlungssubstanzen eine deutliche Hemmung auf die VEGF-Sekretion festzustellen war, wurde anschließend die Wirkung der HDAC-Inhibitoren α -Liponsäure und Butyrat zeit- und konzentrationsabhängig auf die intrazelluläre Expression von VEGF auf Proteinebene untersucht.

3.4.2.1 VEGF-Expression 48 h nach Behandlung mit α -Liponsäure

Um den Einfluss der eingesetzten Behandlungssubstanzen auf die Proteinexpression von VEGF bestimmen zu können, wurden subkonfluente MIA-PaCa-2 Zellen in Standardmedium bzw. Medium supplementiert mit α -Liponsäure (1-5mM/L) inkubiert. Die Probengewinnung erfolgte nach 48 Stunden. Mittels eines spezifischen Antikörpers wurde das VEGF-Protein mittels der Western Blot Methode nachgewiesen. Die Bestimmung von β -Actin diente in den Proben als quantitative Kontrolle mit gleicher Proteinmenge. Die Western Blots wurden anschließend densitometrisch ausgewertet und im Verhältnis zu β -Actin quantifiziert. Die Ergebnisse in Prozent der jeweiligen Kontrolle wurden graphisch dargestellt.

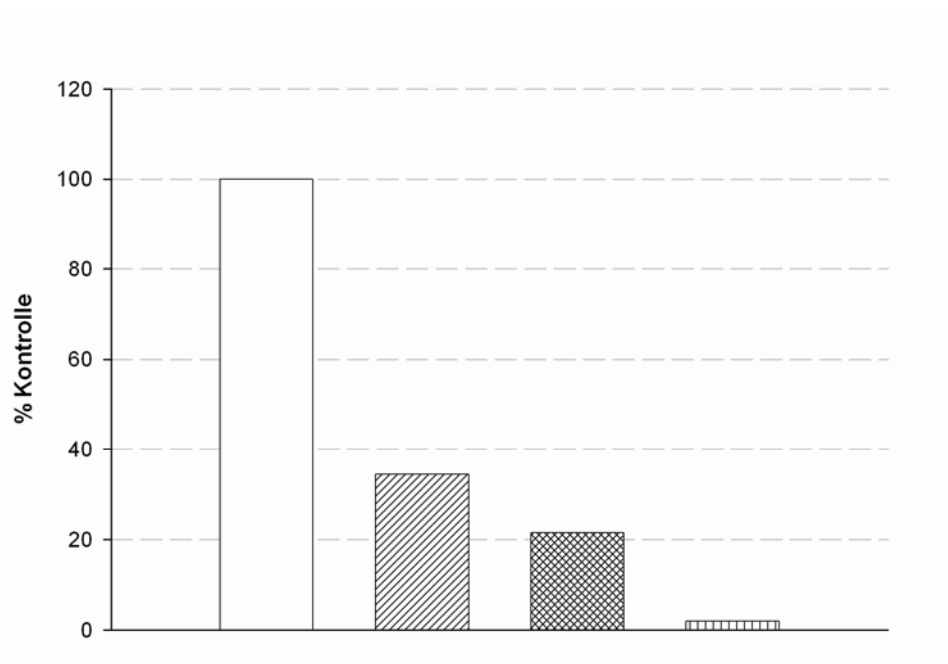
Wie in **Abbildung 3.4c** erkennbar, wird die Proteinexpression von VEGF in MIA-PaCa-2 Zellen durch die Behandlung mit α -Liponsäure nach 48 Stunden in allen Konzentrationen gehemmt. Die Abnahme der VEGF Expression ist bei Einsatz von α -Liponsäure in einer Konzentration von 5mM/L nach 48 Stunden Inkubationsdauer am deutlichsten ersichtlich.

Die densitometrische Auswertung dieses Western Blots (**Abbildung 3.4d**) zeigte für α -Liponsäure (1mM/L) eine Abnahme der VEGF Proteinexpression auf 34 % der Kontrolle. Nach Inkubation mit α -Liponsäure (2mM/L) konnte eine Reduktion des VEGF Proteins auf 22 % der Kontrolle beobachtet werden, während die Behandlung mit α -Liponsäure (5mM/L) zur stärksten Abnahme der VEGF Proteinexpression auf nur 2 % der Kontrolle führte.



α -Liponsäure (mM/L) - 1 2 5

Abbildung 3.4c Western Blot des VEGF Proteins in der Cytoplasma Fraktion der MIA-PaCa-2 Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit α -Liponsäure (1mM/L, 2mM/L, 5mM/L). Repräsentativ ist einer von drei unabhängigen Western Blots dargestellt.



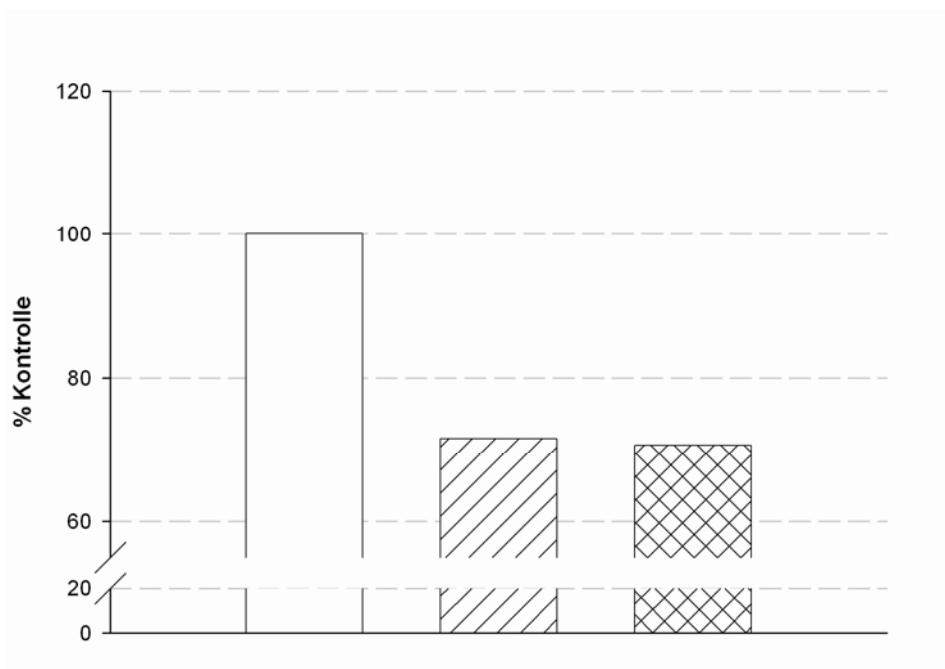
α -Liponsäure (mM/L) - 1 2 5

Abbildung 3.4d Quantifizierung des VEGF Proteins in der Cytoplasma Fraktion der MIA-PaCa-2 Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit α -Liponsäure (1mM/L, 2mM/L, 5mM/L). Der Western Blot aus Abbildung 3.4c wurde densitometrisch ausgewertet und im Verhältnis zu β -Actin quantifiziert.

3.4.2.2 VEGF-Expression 48 h nach Behandlung mit Butyrat



Abbildung 3.4e Western Blot des VEGF Proteins in der Cytoplasma Fraktion der MIA-PaCa-2 Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit Butyrat (1mM/L, 2mM/L). Repräsentativ ist einer von drei unabhängigen Western Blots dargestellt.



Butyrat (mM/L) - 1 2

Abbildung 3.4f Quantifizierung des VEGF Proteins in der Cytoplasma Fraktion aus MIA-PaCa-2 Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit Butyrat (1mM/L, 2mM/L). Der Western Blot aus Abbildung 3.3e wurde densitometrisch ausgewertet und im Verhältnis zu β -Actin quantifiziert.

Abbildung 3.4e zeigt eine Abnahme der VEGF Proteinexpression nach 48 Stunden Inkubation mit Butyrat (1mM/L). Die Behandlung mit Butyrat (2mM/L) führte zu einer nur unwesentlich stärkeren Reduktion des VEGF Proteins nach 48-stündiger Inkubation.

In der densitometrische Auswertung der Western Blot Banden (**Abbildung 3.4f**) ist die eindeutige Hemmung der VEGF Proteinexpression nach Inkubation mit Butyrat deutlich zu erkennen. Nach 48 Stunden Behandlung mit Butyrat (1mM/L) ist eine Abnahme der VEGF Expression auf 72 % der Kontrolle zu beobachten. Die Inkubation mit Butyrat (2mM/L) führte im Vergleich dazu nur zu einer geringgradig stärkeren Reduktion des VEGF Proteins auf 71 % der Kontrolle.

3.5 Einfluss von α -Liponsäure und Butyrat auf den Angiogenese relevanten Faktor HIF-1 α

Der Transkriptionsfaktor HIF-1 α wird nachweislich im humanen Pankreaskarzinom vermehrt exprimiert [77]. In verschiedenen Studien konnte gezeigt werden, dass HIF-1 α die Neovaskularisation und somit die Progression eines Tumors fördert und signifikant mit der Metastasierung korreliert (siehe Kap. 1.3.5). Dies geschieht maßgeblich über die Expression von Genen, die für Wachstumsfaktoren - wie auch den *vascular endothelial growth factor* - kodieren, was wiederum die Angiogenese und dadurch das Wachstum des Tumors induziert [76,78]. Im folgenden Teil der Arbeit wurde die Wirkung der verschiedenen HDAC-Inhibitoren auf die Expression von HIF-1 α untersucht.

Subkonfluente MIA-PaCa-2 Zellen wurden für 12 Stunden mit Standardmedium bzw. α -Liponsäure (1-5mM/L) – supplementiertem Medium oder Butyrat (1-2mM) – supplementiertem Medium inkubiert. Nach der Probengewinnung erfolgte die Detektion des HIF-1 α Proteins im Western Blot mittels eines spezifischen Antikörpers. Die Banden der Western Blots wurden anschließend densitometrisch ausgewertet und im Verhältnis zu β -Actin, das als quantitative Kontrolle diente, quantifiziert. Die Resultate sind in Prozent der jeweiligen Kontrolle graphisch dargestellt.

3.5.1 Proteinexpression von HIF-1 α nach Behandlung mit α -Liponsäure

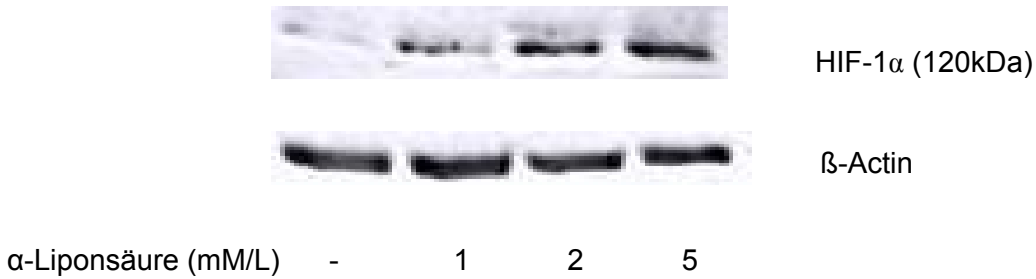
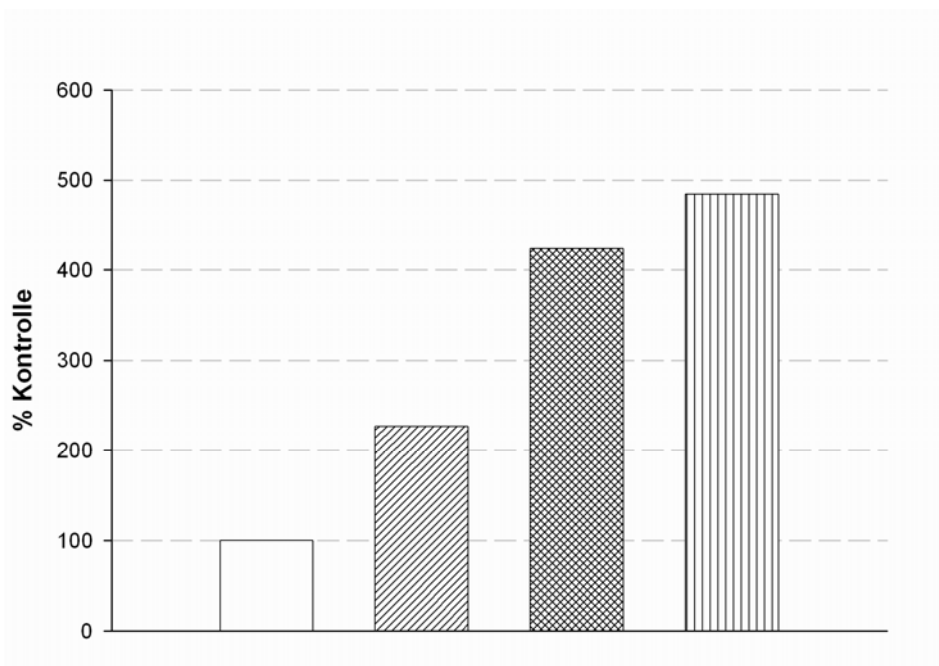


Abbildung 3.5a Western Blot des HIF-1 α Proteins in der Cytoplasma Fraktion der MIA-PaCa-2 Zellen nach 12-stündiger Inkubation mit α -Liponsäure (1-5mM/L). Repräsentativ ist einer von drei unabhängigen Western Blots dargestellt.



α -Liponsäure (mM/L) - 1 2 5

Abbildung 3.5b Quantifizierung des HIF-1 α Proteins in der Cytoplasma Fraktion der MIA-PaCa-2 Zellen nach 12-stündiger Inkubation mit α -Liponsäure (1-5mM/L). Der Western Blot aus Abbildung 3.4a wurde densitometrisch ausgewertet und im Verhältnis zu β -Actin quantifiziert.

In **Abbildung 3.5a** ist eine deutliche Zunahme der HIF-1 α Proteinexpression im Zelllysate nach 12 Stunden Inkubation mit α -Liponsäure (1mM/L, 2mM/L, 5mM/L) zu erkennen. Diese Steigerung des HIF-1 α Proteins nimmt mit zunehmender Konzentration zu.

Die densitometrische Auswertung der Western Blot Banden zeigt in **Abbildung 3.5b** für α -Liponsäure (1mM/L) einen Anstieg der HIF-1 α Proteinexpression auf 227 % der Kontrolle. Nach 12-stündiger Behandlung mit α -Liponsäure (2mM/L) konnte eine verstärkte Expression des HIF-1 α Proteins auf 424 % und bei Behandlung mit α -Liponsäure (5mM/L) auf 484 % im Vergleich zur Kontrolle verzeichnet werden.

3.5.2 Proteinexpression von HIF-1 α nach Behandlung mit Butyrat

Wie an **Abbildung 3.5c** erkennbar führt auch Butyrat zu einer deutlichen Steigerung der HIF-1 α Proteinexpression in MIA-PaCa-2 Zellen. Die Zunahme von HIF-1 α nach 12 Stunden Inkubation mit Butyrat (1mM/L, 2mM/L) nahm mit zunehmender Butyratkonzentration zu.

Die Western Blot Banden wurden in **Abbildung 3.5d** densitometrisch ausgewertet. Nach Inkubation mit Butyrat (1mM/L) konnte eine Zunahme des HIF-1 α Proteins auf 154 % der Kontrolle verzeichnet werden. Die Behandlung mit Butyrat (2mM/L) ließ eine Steigerung auf 389 % im Vergleich zur Kontrolle erkennen.

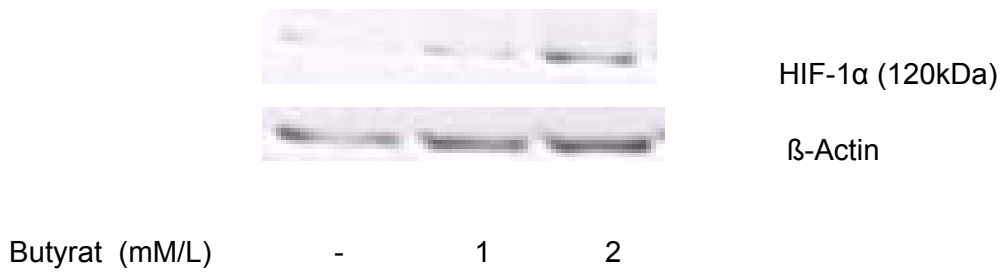
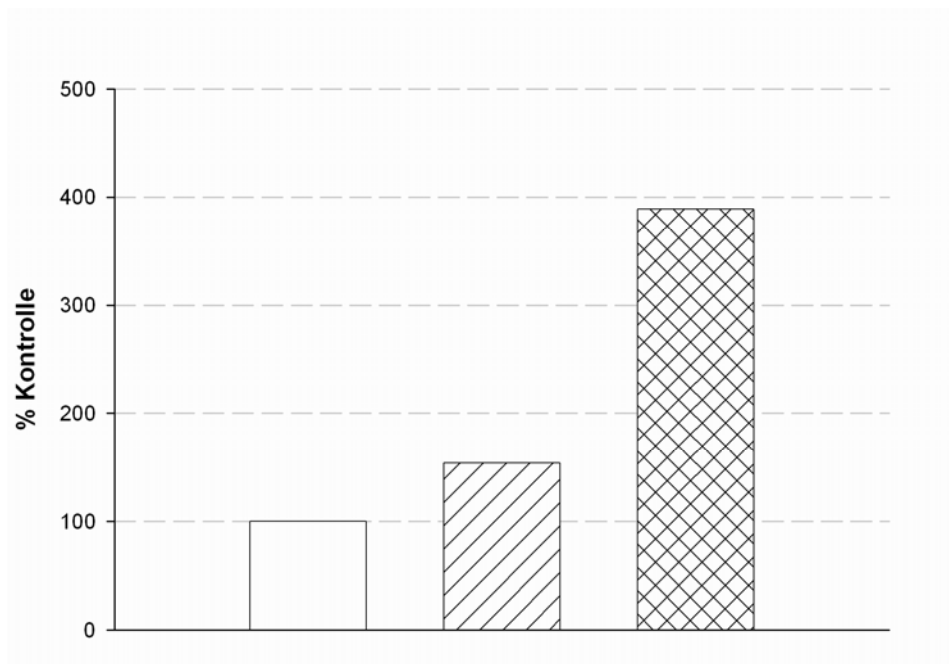


Abbildung 3.5c Western Blot des HIF-1 α Proteins in der Cytoplasma Fraktion der MIA-PaCa-2 Zellen nach 12-stündiger Inkubation mit Butyrat (1mM/L, 2mM/L). Repräsentativ ist einer von drei unabhängigen Western Blots dargestellt.



Butyrat (mM/L) - 1 2

Abbildung 3.5d Quantifizierung des HIF-1 α Proteins in der Cytoplasma Fraktion aus MIA-PaCa-2 Zellen nach 12-stündiger Inkubation mit Butyrat (1mM/L, 2mM/L). Der Western Blot aus Abbildung 3.4c wurde densitometrisch ausgewertet und im Verhältnis zu β -Actin quantifiziert.

3.6 Einfluss von α -Liponsäure im Vergleich zu Butyrat auf die VDR-Expression in MIA-PaCa-2 Zellen

Nächstes Ziel der Arbeit war es mögliche Wirkmechanismen, die diesen Vorgängen zugrunde liegen könnten, zu untersuchen. In Studien konnte gezeigt werden, dass die antineoplastischen Effekte verschiedener HDAC-Inhibitoren in Zusammenhang stehen mit der aktiven Form von Vitamin D₃ (1,25-Dihydroxycholecalciferol). Vitamin D₃ selbst wirkt differenzierungsfördernd und antiproliferativ auf eine Vielzahl tumoröser Zellen. Nachweislich zeigte Butyrat in mehreren neoplastischen Zelllinien synergistisch mit 1,25-Dihydroxycholecalciferol tumorhemmende Effekte [34,80]. Diese scheinen Vitamin D₃ - rezeptorvermittelt zu sein, da eine Hemmung des Tumorwachstums bei Fehlen des Vitamin D Rezeptors nicht zu beobachten war. In Untersuchungen konnte gezeigt werden, dass diese Wirkung in humanen CaCo-2 Zellen aus der Butyrat-induzierten up-Regulation von VDR resultiert, die auf Protein- und mRNA-Ebene nachgewiesen werden konnte (siehe Kap. 1.3.6).

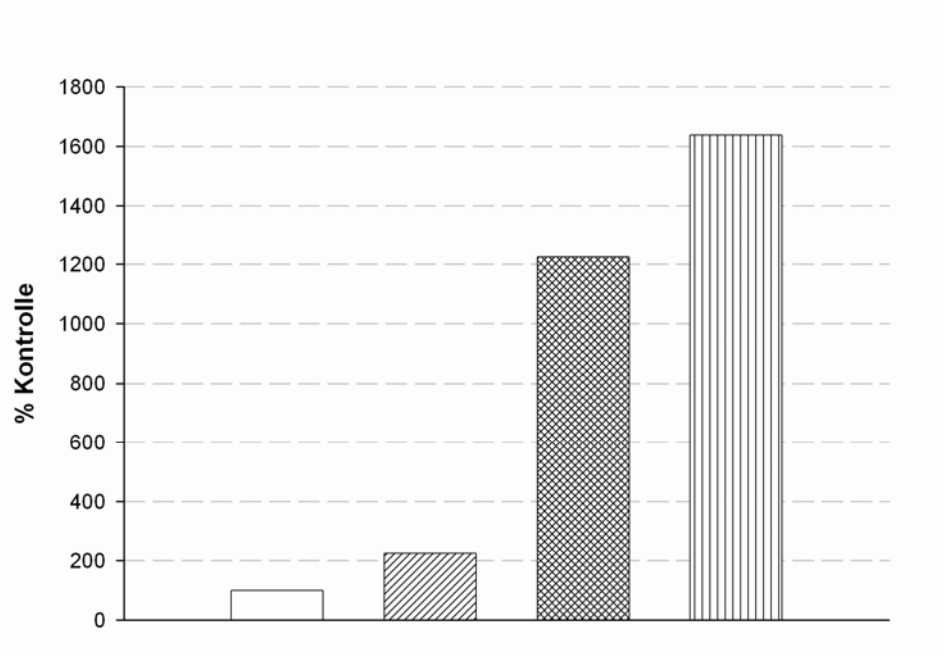
Um die Wirkungen der hier verwendeten HDAC-Inhibitoren α -Liponsäure bzw. Butyrat auf die Proteinexpression von VDR zu untersuchen, wurden subkonfluente MIA-PaCa-2 Zellen in Standardmedium bzw. Medium supplementiert mit α -Liponsäure (1-5mM/L) bzw. Butyrat (1-2mM/L) inkubiert. Zu bestimmten Zeiten erfolgte die Probengewinnung und die Detektion des VDR Proteins mittels eines spezifischen Antikörpers nach der Western Blot Methode. Als quantitative Kontrolle gleicher Proteinmenge diente die Bestimmung von β -Actin in den Proben. Die Western Blots wurden anschließend densitometrisch ausgewertet und im Verhältnis zu β -Actin quantifiziert. Die Ergebnisse in Prozent der jeweiligen Kontrolle wurden graphisch dargestellt.

3.6.1 VDR-Expression in MIA-PaCa-2 Zellen 12h nach Behandlung mit α -Liponsäure



α -Liponsäure (mM/L) - 1 2 5

Abbildung 3.6a Western Blot des VDR Proteins in der nukleären Fraktion der MIA-PaCa-2 Zellen nach 12-stündiger Inkubation mit α -Liponsäure (1-5mM/L). Repräsentativ ist einer von drei unabhängigen Western Blots dargestellt.



α -Liponsäure (mM/L) - 1 2 5

Abbildung 3.6b Quantifizierung des VDR Proteins in der nukleären Fraktion der MIA-PaCa-2 Zellen nach 12-stündiger Inkubation mit α -Liponsäure (1-5mM/L). Der Western Blot aus Abbildung 3.5a wurde densitometrisch ausgewertet und im Verhältnis zu β -Actin quantifiziert.

Abbildung 3.6a zeigt eine Zunahme des VDR Proteins bei Behandlung mit α -Liponsäure (1mM/L, 2mM/L, 5mM/L). Die VDR-Expression nahm mit zunehmender Konzentration von α -Liponsäure zu. Nach 12 Stunden Inkubation war die Steigerung von VDR für α -Liponsäure (5mM/L) am stärksten.

Die densitometrische Auswertung der Western Blot Banden (**Abbildung 3.6b**) ergab für α -Liponsäure (1mM/L) einen Anstieg der VDR Proteinexpression auf 225 %. Die Behandlung mit α -Liponsäure (2mM/L) führte nach 12 Stunden zu einer Zunahme des VDR-Proteins auf 1225 % und mit α -Liponsäure (5mM/L) auf 1638 % im Vergleich zur Kontrolle.

3.6.2 VDR-Expression in MIA-PaCa-2 Zellen 12h und 24h nach Behandlung mit Butyrat

3.6.2.1 VDR-Expression nach 12h

Wie in **Abbildung 3.6c** ersichtlich führte die Behandlung von Mia-PaCa-2 Zellen mit Butyrat (1mM/L, 2mM/L) zur Steigerung der VDR Proteinexpression. Nach 12-stündiger Inkubation war die Zunahme des VDR Proteins für Butyrat (1mM/L) stärker als bei Behandlung mit Butyrat (2mM/L).

In der densitometrischen Auswertung des Western Blots (**Abbildung 3.6d**) betrug der VDR-Anstieg in der nukleären Fraktion der Mia-PaCa-2 Zellen für Butyrat (1mM/L) 423 % und für Butyrat (2mM/L) 387 % im Vergleich zur Kontrolle.

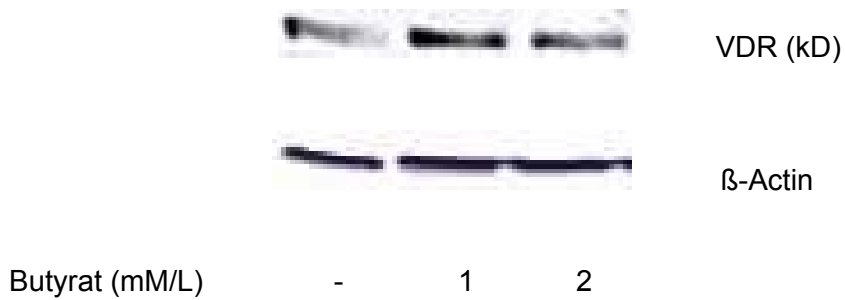
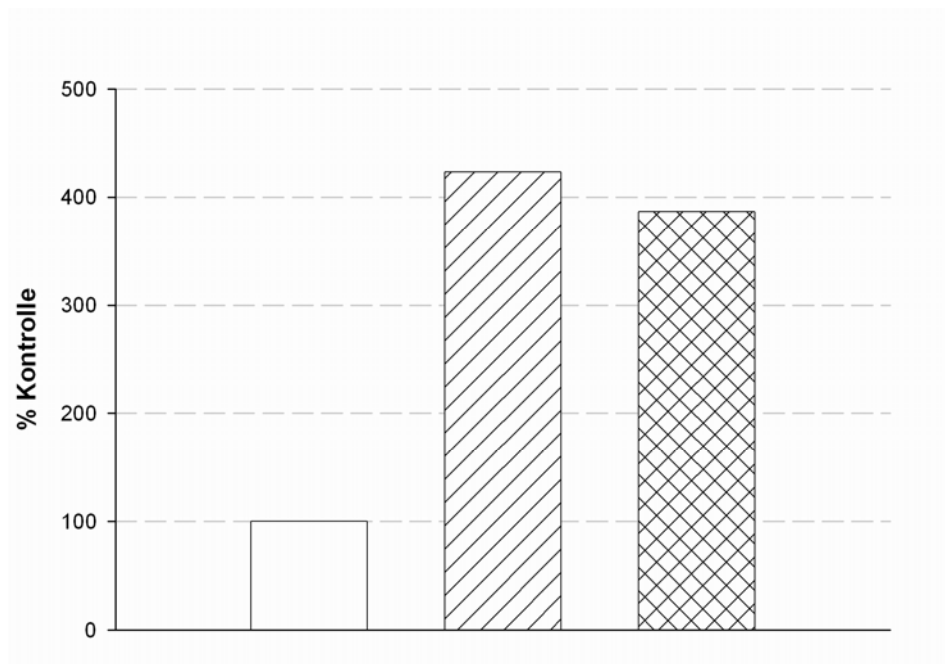


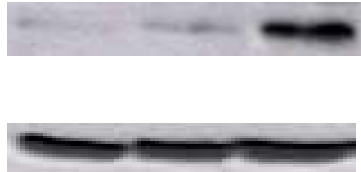
Abbildung 3.6c Western Blot des VDR Proteins in der nukleären Fraktion der MIA-PaCa-2 Zellen nach 12-stündiger Inkubation mit Butyrat (1mM/L, 2mM/L). Repräsentativ ist einer von drei unabhängigen Western Blots dargestellt.



Butyrat (mM/L) - 1 2

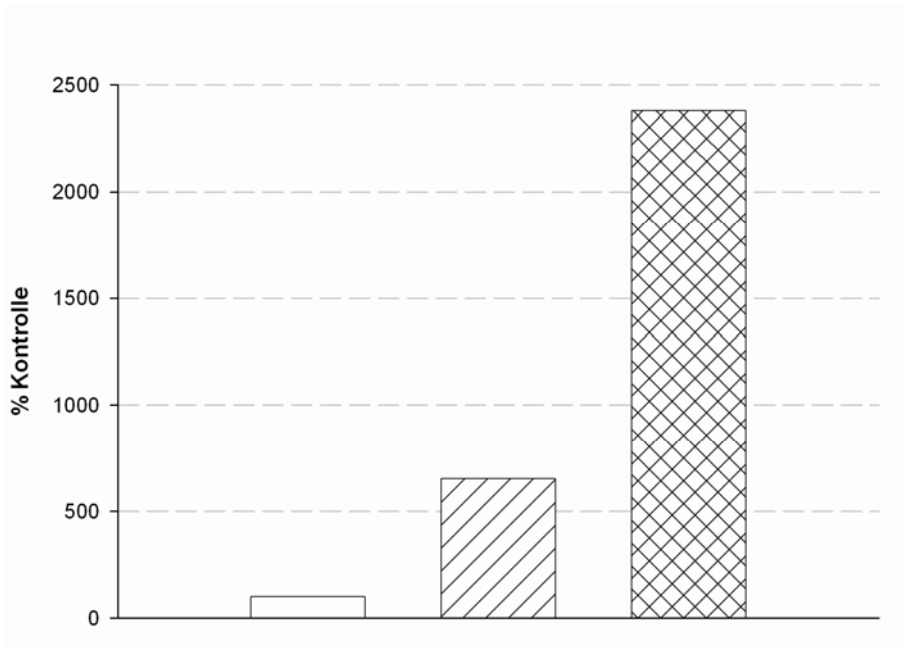
Abbildung 3.6d Quantifizierung des VDR Proteins in der nukleären Fraktion der MIA-PaCa-2 Zellen nach 12-stündiger Inkubation mit Butyrat (1mM/L, 2mM/L). Der Western Blot aus Abbildung 3.6c wurde densitometrisch ausgewertet und im Verhältnis zu β -Actin quantifiziert.

3.6.2.2 VDR-Expression nach 24h



Butyrat (mM/L) - 1 2

Abbildung 3.6e Western Blot des VDR Proteins in der nukleären Fraktion der MIA-PaCa-2 Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Butyrat (1mM/L, 2mM/L). Repräsentativ ist einer von drei unabhängigen Western Blots dargestellt.



Butyrat (mM/L) - 1 2

Abbildung 3.6f Quantifizierung des VDR Proteins in der nukleären Fraktion der MIA-PaCa-2 Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Butyrat (1mM/L, 2mM/L). Der Western Blot aus Abbildung 3.6e wurde densitometrisch ausgewertet und im Verhältnis zu β -Actin quantifiziert.

Nach 24-stündiger Inkubation der Mia-PaCa-2 Zellen mit Butyrat (1mM/L, 2mM/L) war im Gegensatz zur 12-stündigen Behandlung ein Anstieg der VDR-Proteinexpression vergleichbar mit der Behandlung der Zellen mit α -Liponsäure (1mM/L, 2mM/L) zu beobachten.

Die Zunahme des VDR Proteins war für Butyrat (2mM/L) deutlich stärker als für Butyrat (1mM/L) (**Abbildung 3.6e**).

In **Abbildung 3.6f** zeigte die densitometrische Auswertung der Western Blot Banden bei Behandlung mit Butyrat (1mM/L) einen Anstieg von 653 %; nach 24 Stunden Inkubation mit Butyrat (2mM/L) war eine Zunahme des VDR Proteins auf 2379 % im Vergleich zur Kontrolle zu erkennen.

3.7 Einfluss von α -Liponsäure und Butyrat auf die p38- und pp38-Expression in MIA-PaCa-2 Zellen unter Verwendung des p38-Inhibitors SB203580

Als wichtiger Signalweg in der Butyrat-induzierten VDR-Expression von CaCo-2-Zellen gilt die Mitogen-aktivierte Proteinkinase - Signalkaskade. Butyrat führt nachweislich in CaCo-2 Zellen über die Induktion der p38-MAPK zu einer Steigerung der VDR-Expression. Ihre Aktivität erhalten MAPKs nach ihrer Phosphorylierung. Für CaCo-2 Zellen konnte mittels der Western Blot Methode die p38-Phosphorylierung zu phospho-p38 (pp38) analysiert werden und unter Verwendung eines spezifischen Hemmstoffes von p38 die MAPK - Signalkaskade weiter charakterisiert werden (siehe Kap.1.3.7).

Weiteres Ziel dieser Arbeit war es, die Rolle der p38 - MAPK - Signalkaskade im Rahmen der HDAC-Aktivierung für die MIA-PaCa-2 Zelllinie zu untersuchen. Von Interesse war deshalb die Wirkung verschiedener HDAC-Inhibitoren auf die p38- und die pp38- Proteinexpression in den Pankreaskarzinomzellen. Unter Verwendung des spezifischen p38-Inhibitors SB203580 wurde der Einfluss von α -Liponsäure und Butyrat auf die Expression der spezifischen Proteine analysiert. Hierzu wurden subkonfluente MIA-PaCa-2 Zellen mit Standardmedium oder Medium supplementiert mit α -Liponsäure (1mM/L) bzw. Butyrat (1mM/L, 2mM/L) +/- dem spezifischen p38-Inhibitor SB203580 für 12 bzw. 24 Stunden inkubiert. Nach der Probengewinnung und der Detektion mittels spezifischem Antikörper nach der Western Blot Methode wurden die Ergebnisse densitometrisch ausgewertet. Die Western Blot Banden wurden im Verhältnis zu β -Actin quantifiziert und die Resultate in Prozent der jeweiligen Kontrolle graphisch dargestellt.

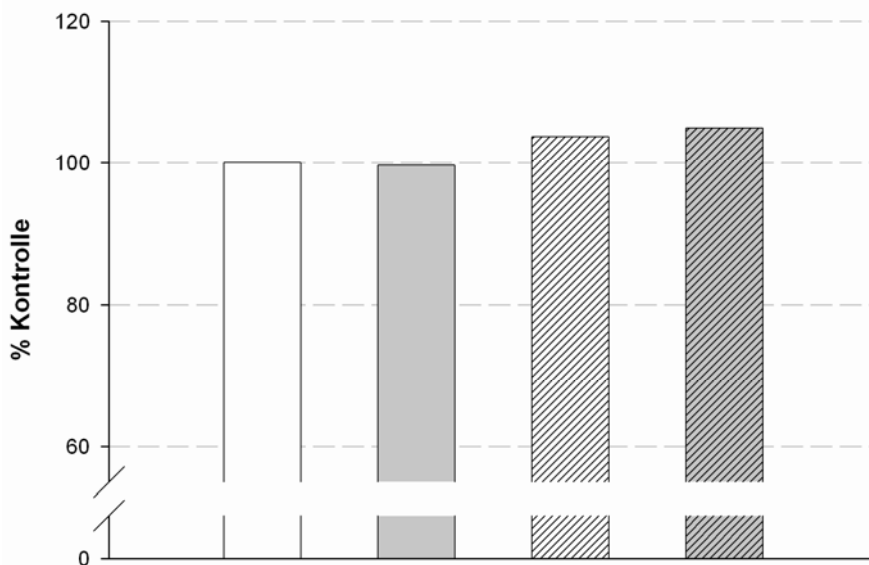
3.7.1 p38-Expression in MIA-PaCa-2 Zellen nach Behandlung mit α -Liponsäure bzw. Butyrat und SB203580

3.7.1.1 Behandlung mit α -Liponsäure und SB203580



α -Liponsäure (mM/L)	-	-	1	1
SB203580	-	+	-	+

Abbildung 3.7a Western Blot des p38 Proteins im Gesamthomogenat der MIA-PaCa-2 Zellen nach 12-stündiger Inkubation mit α -Liponsäure (1mM/L) und dem p38-Inhibitor SB203580. Repräsentativ ist einer von drei unabhängigen Western Blots dargestellt.



α -Liponsäure (mM/L)	-	-	1	1
SB203580	-	+	-	+

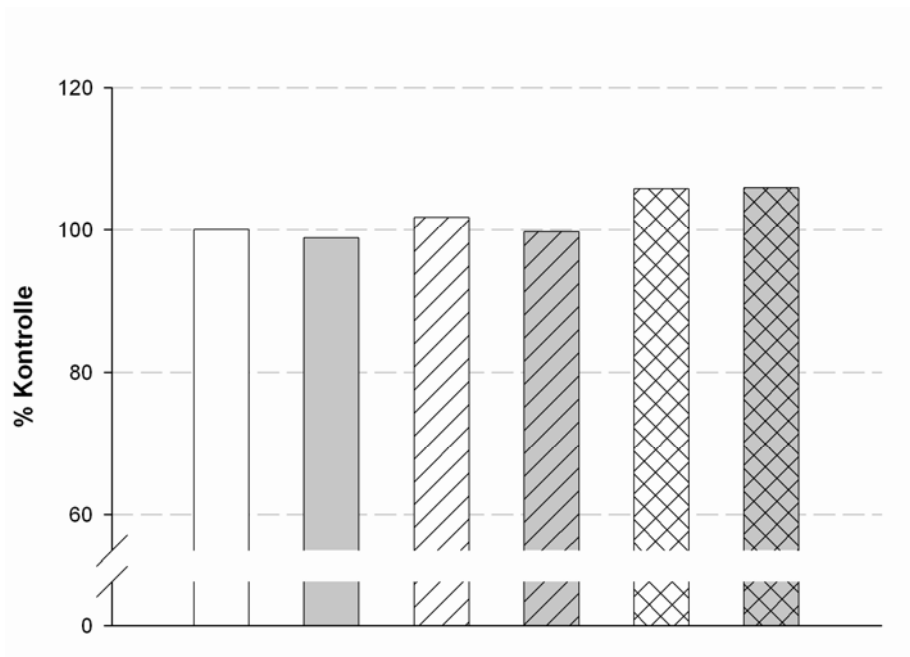
Abbildung 3.7b Quantifizierung des p38 Proteins im Gesamthomogenat der MIA-PaCa-2 Zellen nach 12-stündiger Inkubation mit α -Liponsäure (1mM/L) und dem p38-Inhibitor SB203580. Der Western Blot aus Abbildung 3.6a wurde densitometrisch ausgewertet und im Verhältnis zu β -Actin quantifiziert.

3.7.1.2 Behandlung mit Butyrat und SB203580



Butyrat (mM/L)	-	-	1	1	2	2
SB203580	-	+	-	+	-	+

Abbildung 3.7c Western Blot des p38 Proteins im Gesamthomogenat der MIA-PaCa-2 Zellen nach 12-stündiger Inkubation mit Butyrat (1mM/L, 2mM/L) und dem p38-Inhibitor SB203580. Repräsentativ ist einer von drei unabhängigen Western Blots dargestellt.



Butyrat (mM/L)	-	-	1	1	2	2
SB203580	-	+	-	+	-	+

Abbildung 3.7d Quantifizierung des p38 Proteins im Gesamthomogenat der MIA-PaCa-2 Zellen nach 12-stündiger Inkubation mit Butyrat (1mM/L, 2mM/L) und dem p38-Inhibitor SB203580. Der Western Blot aus Abbildung 3.6c wurde densitometrisch ausgewertet und im Verhältnis zu β -Actin quantifiziert.

Wie aus den **Abbildungen 3.7a und 3.7c** ersichtlich ist, veränderte sich die Expression des p38 Proteins im Western Blot sowohl nach Inkubation der MIA-PaCa-2 Zellen mit dem p38-Inhibitor SB203580 und α -Liponsäure (1mM/L) bzw. Butyrat (1mM/L, 2mM/L) nicht merklich.

Die **Abbildungen 3.7b und 3.7d** zeigen die densitometrische Auswertung der Western Blot Banden: sowohl die Behandlung mit α -Liponsäure (1mM/L) als auch mit Butyrat (1mM/L, 2mM/L) zusammen mit SB203580 führten nach 12-stündiger Inkubation zu keiner wesentlichen Wirkung auf die p38 - Proteinexpression (α -Liponsäure (1mM/L) : 104 %; α -Liponsäure (1mM/L) + SB203580 nach 12 Stunden : 105 %; Butyrat (1mM/L) : 102 %, Butyrat (1mM/L) + SB203580 : 99 %, Butyrat (2mM/L) : 106 %, Butyrat (2mM/L) SB 203580 : 106 %).

3.7.2 pp38-Expression in MIA-PaCa-2 Zellen nach Behandlung mit α -Liponsäure bzw. Butyrat und SB203580

3.7.2.1 Behandlung mit α -Liponsäure und SB203580

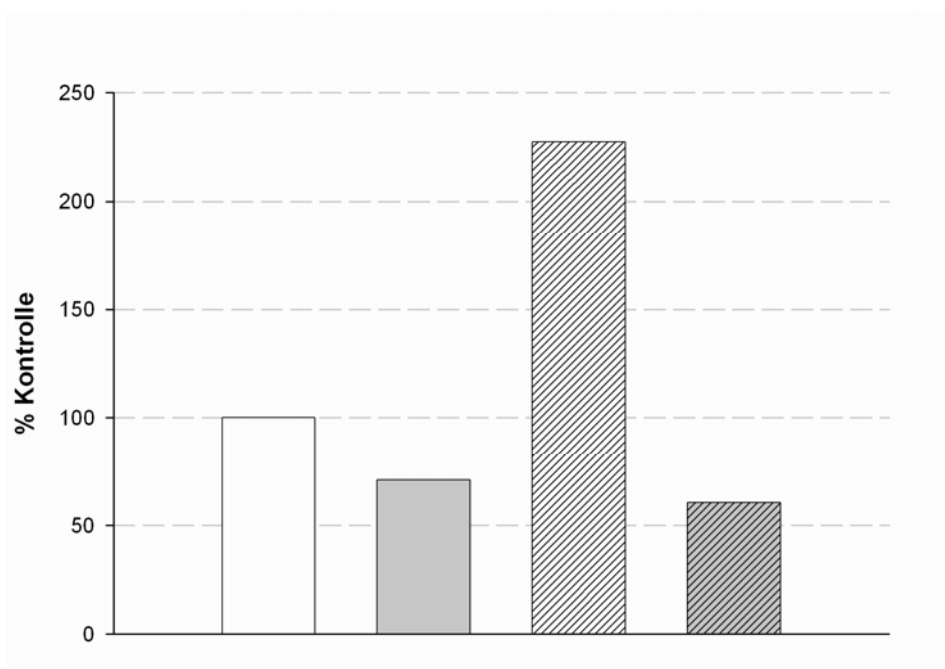
Wie aus der **Abbildung 3.7e** ersichtlich führte die Behandlung des Gesamthomogenats von MIA-PaCa-2 Zellen bei alleiniger Behandlung mit dem p38-Inhibitor SB203580 zu einer reduzierten Phosphorylierung der p38 MAP-Kinase. Nach Behandlung der Zellen mit α -Liponsäure (1mM/L) ist im Vergleich zur Kontrolle ein Anstieg der p38 Phosphorylierung zu erkennen, welche deutlich gehemmt wird bei Zugabe von SB203580.

In der densitometrischen Auswertung der Western Blot Banden (**Abbildung 3.7f**) ergab die Behandlung mit SB203580 eine Abnahme der Phosphorylierung der p38 MAP-Kinase auf 71 %. Nach Zugabe von α -Liponsäure lag diese bei 227 % im Vergleich zur Kontrolle. Die Behandlung der MIA-PaCa Zellen mit α -Liponsäure und SB203580 reduzierte die p38 Phosphorylierung auf 61 % der Kontrolle.



α -Liponsäure (mM/L)	-	-	1	1
SB203580	-	-	+	+

Abbildung 3.7e Western Blot des pp38 Proteins im Gesamthomogenat der MIA-PaCa-2 Zellen nach 12-stündiger Inkubation mit α -Liponsäure (1mM/L) und dem p38-Inhibitor SB203580. Repräsentativ ist einer von drei unabhängigen Western Blots dargestellt.

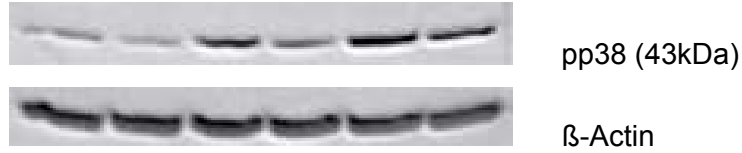


α -Liponsäure (mM/L)	-	-	1	1
SB203580	-	+	-	+

Abbildung 3.7f Quantifizierung des pp38 Proteins im Gesamthomogenat der MIA-PaCa-2 Zellen nach 12-stündiger Inkubation mit α -Liponsäure (1mM/L) und dem p38-Inhibitor SB203580. Der Western Blot aus Abbildung 3.6e wurde densitometrisch ausgewertet und im Verhältnis zu β -Actin quantifiziert.

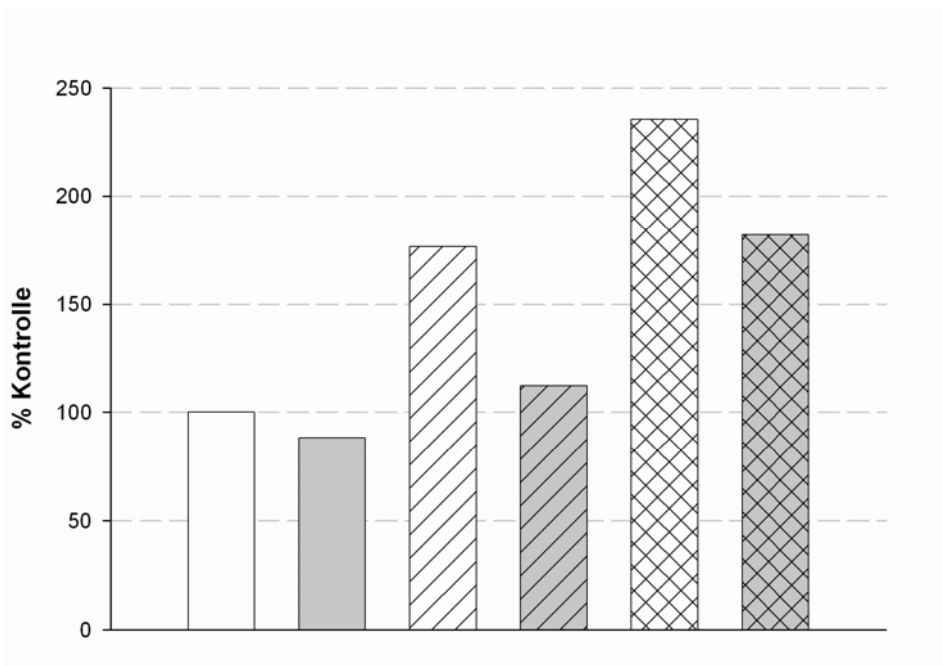
3.7.2.2 Behandlung mit Butyrat und SB203580

12h



Butyrat (mM/L)	-	-	1	1	2	2
SB203580	-	+	-	+	-	+

Abbildung 3.7g Western Blot des pp38 Proteins im Gesamthomogenat der MIA-PaCa-2 Zellen nach 12-stündiger Inkubation mit Butyrat (1mM/L, 2mM/L) und dem p38-Inhibitor SB203580. Repräsentativ ist einer von drei unabhängigen Western Blots dargestellt.



Butyrat (mM/L)	-	-	1	1	2	2
SB203580	-	+	-	+	-	+

Abbildung 3.7h Quantifizierung des pp38 Proteins im Gesamthomogenat der MIA-PaCa-2 Zellen nach 12-stündiger Inkubation mit Butyrat (1mM/L, 2mM/L) und dem p38-Inhibitor SB203580. Der Western Blot aus Abbildung 3.6g wurde densitometrisch ausgewertet und im Verhältnis zu β -Actin quantifiziert.

Das Gesamthomogenat der MIA-PaCa-2 Zellen wurde für 12 Stunden mit Butyrat (1mM/L, 2mM/L) und dem spezifischen p38-Inhibitor SB203580 inkubiert (**Abbildung 3.7g**). Eine alleinige Inkubation mit SB203580 führte zur Abnahme der p38 Phosphorylierung im Vergleich zur Kontrolle. Die Behandlung mit Butyrat (1mM/L, 2mM/L) ergab verglichen mit der Kontrolle eine Zunahme der p38 MAP-Kinase Phosphorylierung, während die Inkubation mit Butyrat und SB203580 diese wiederum deutlich reduzierte.

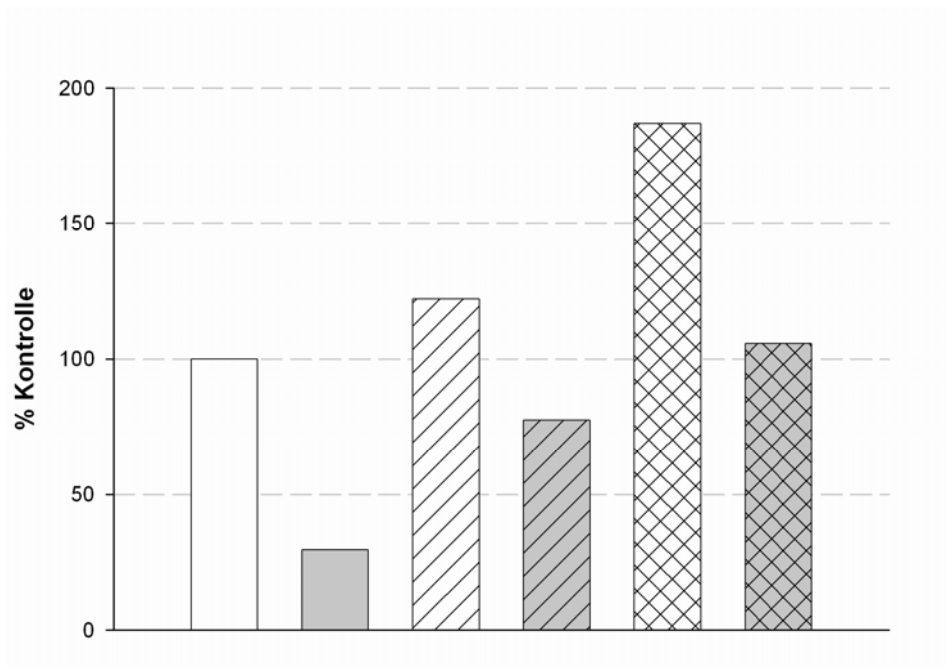
In der densitometrischen Auswertung dieses Western Blots (**Abbildung 3.7h**) zeigte sich für die alleinige Behandlung der Zellen mit SB203580 eine Reduktion der p38 Phosphorylierung auf 88 %. Nach 12 Stunden lag der p38 Phosphorylierungsgrad für Butyrat (1mM/L) bei 177 %, die bei Zugabe von SB203580 auf 112 % absank. Eine Zugabe dieses spezifischen p38-Inhibitors reduzierte die mit Butyrat (2mM/L) behandelten Zellen von 235 % auf 182 %.

24h



Butyrat (mM/L)	-	-	1	1	2	2
SB203580	-	+	-	+	-	+

Abbildung 3.7i Western Blot des pp38 Proteins im Gesamthomogenat der MIA-PaCa-2 Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Butyrat (1mM/L, 2mM/L) und dem p38-Inhibitor SB203580. Repräsentativ ist einer von drei unabhängigen Western Blots dargestellt.



Butyrat (mM/L)	-	-	1	1	2	2
SB203580	-	+	-	+	-	+

Abbildung 3.7j Quantifizierung des pp38 Proteins im Gesamthomogenat der MIA-PaCa-2 Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Butyrat (1mM/L, 2mM/L) und dem p38-Inhibitor SB203580. Der Western Blot aus Abbildung 3.6i wurde densitometrisch ausgewertet und im Verhältnis zu β -Actin quantifiziert.

Nach 24 Stunden ließ sich bei Behandlung des Gesamthomogenats der MIA-PaCa-2 Zellen eine Reduktion der p38 MAP-Kinase Phosphorylierung nach alleiniger Behandlung mit SB203580 verzeichnen. Die Inkubation mit Butyrat (1mM/L, 2mM/L) zeigte eine deutliche Zunahme im Vergleich zur Kontrolle, die mit steigender Konzentration von Butyrat stärker wurde. Bei Inkubation mit Butyrat (1mM/L, 2mM/L) und SB203580 kam es wiederum zur Abnahme der p38 Phosphorylierung (**Abbildung 3.7i**).

Die densitometrische Auswertung der Western Blot Banden (**Abbildung 3.7j**) zeigte für das Gesamthomogenat von MIA-PaCa-2 und SB203580 eine Reduktion auf 30 % im Vergleich zur Kontrolle. Die Behandlung mit Butyrat (1mM/L) ergab eine Steigerung des p38 Phosphorylierungsgrads auf 122 %, die bei Zugabe von SB203580 auf 77 % gesenkt wurde. Butyrat (2mM/L) bewirkte eine Zunahme der p38 Phosphorylierung auf 187 %. Zusammen mit SB203580 fiel diese auf 106 % im Vergleich zur Kontrolle.

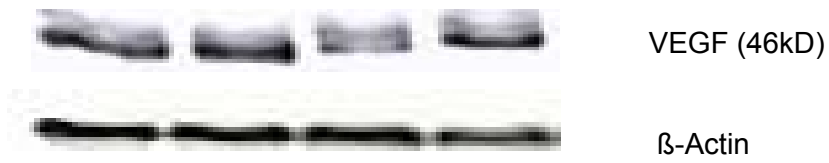
3.8 Einfluss von α -Liponsäure und Butyrat auf die VEGF-Expression in MIA-PaCa-2 Zellen unter Einsatz des p38-Inhibitors SB203580

Abschließend sollte in dieser Arbeit festgestellt werden ob die in Kapitel 3.6 dargestellte MAPK - Signalkaskade ebenso in Zusammenhang steht mit der Expression von VEGF in MIA-PaCa-2 Zellen. Hierzu wurden subkonfluente MIA-PaCa-2 Zellen mit α -Liponsäure bzw. Butyrat +/- dem spezifischen p38-Inhibitor SB203580 inkubiert. Nach 48 Stunden erfolgte die Probengewinnung, die Detektion mittels spezifischem Antikörper nach der Western Blot Methode und die densitometrische Auswertung dieser Ergebnisse. Die Western Blot Banden wurden im Verhältnis zu β -Actin quantifiziert und die Resultate in Prozent der jeweiligen Kontrolle graphisch dargestellt.

3.8.1 VEGF-Expression in MIA-PaCa-2 Zellen 48 h nach Behandlung mit α -Liponsäure und SB203580

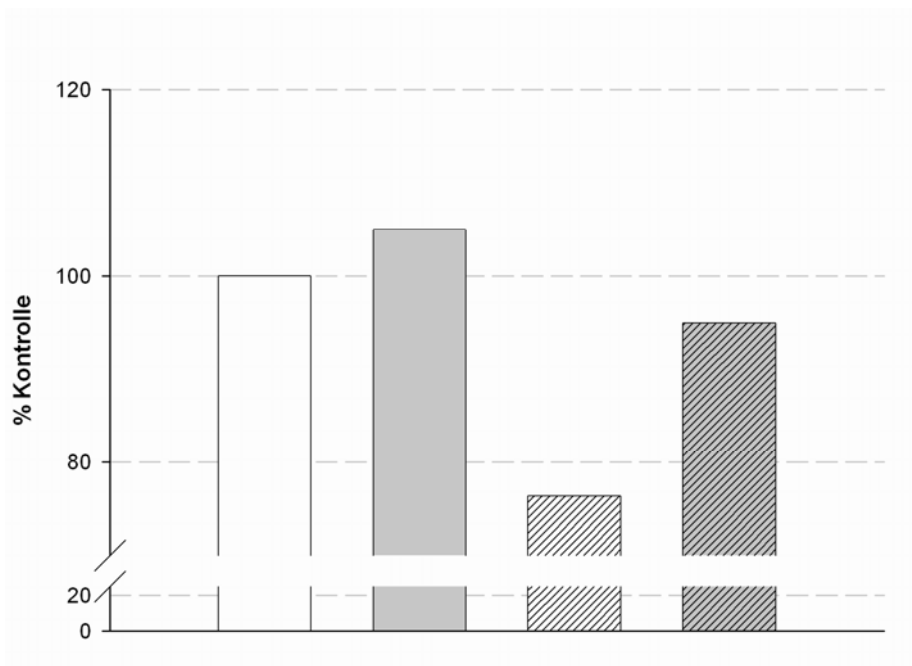
Abbildung 3.8a zeigte eine deutlich Steigerung der VEGF Proteinexpression unter 48-stündiger Behandlung mit dem p38-Inhibitor SB203580 sowohl der Kontrolle als auch nach Inkubation mit α -Liponsäure (1mM/L). Gleichzeitig wird hier nochmals die insgesamt reduzierte VEGF-Expression in MIA-PaCa-2 Zellen nach 48 Stunden Behandlung mit α -Liponsäure im Vergleich zur Kontrolle deutlich (siehe Kapitel 3.3.2.1).

Die densitometrische Auswertung dieses Western Blots in **Abbildung 3.8b** lässt die Zunahme der VEGF Proteinexpression bei Behandlung mit dem p38-Inhibitor SB203580 auf 105 % der Kontrolle erkennen. Nach Inkubation der MIA-PaCa-2 Zellen mit α -Liponsäure und SB203580 beträgt die Zunahme des VEGF Proteins 80 % im Vergleich zur alleinigen Behandlung mit α -Liponsäure (76 %).



α -Liponsäure (mM/L)	-	-	1	1
SB203580	-	+	-	+

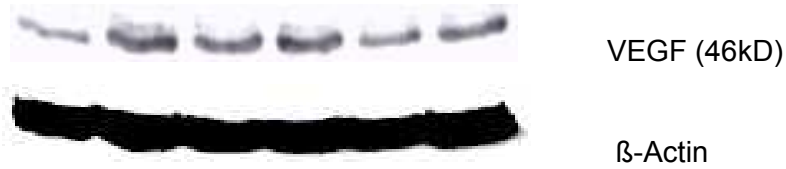
Abbildung 3.8a Western Blot des VEGF Proteins im Gesamthomogenat der MIA-PaCa-2 Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit α -Liponsäure (1mM/L) und dem p38-Inhibitor SB203580. Repräsentativ ist einer von drei unabhängigen Western Blots dargestellt.



α -Liponsäure (mM/L)	-	-	1	1
SB203580	-	+	-	+

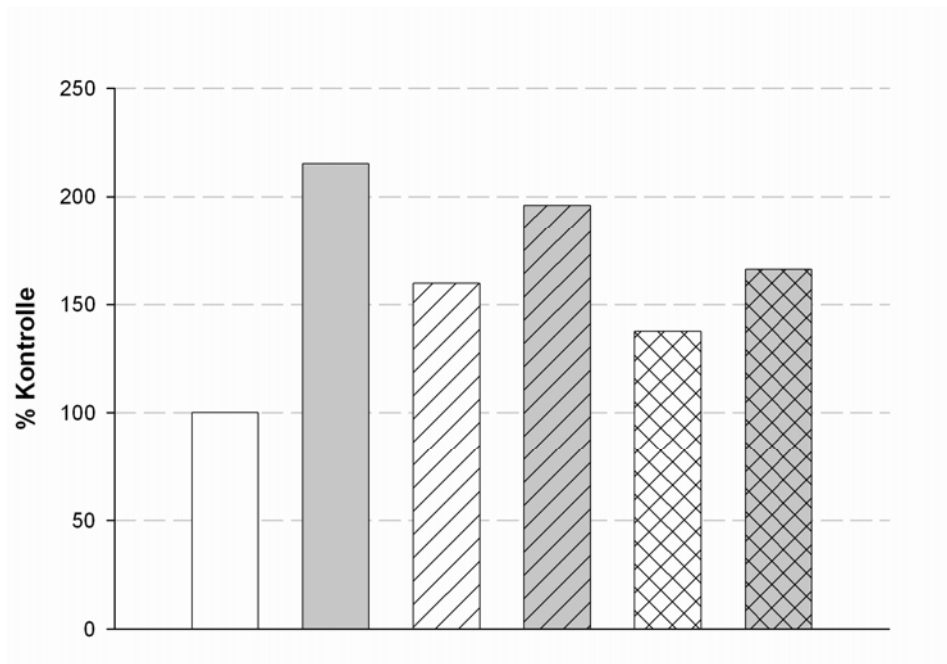
Abbildung 3.8b Quantifizierung des VEGF Proteins im Gesamthomogenat der MIA-PaCa-2 Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit α -Liponsäure (1mM/L) und dem p38-Inhibitor SB203580. Der Western Blot aus Abbildung 3.7a wurde densitometrisch ausgewertet und im Verhältnis zu β -Actin quantifiziert.

3.8.2 VEGF-Expression in MIA-PaCa-2 Zellen 48 h nach Behandlung mit Butyrat und SB203580



Butyrat (mM/L)	-	-	1	1	2	2
SB203580	-	+	-	+	-	+

Abbildung 3.8c Western Blot des VEGF Proteins im Gesamthomogenat der MIA-PaCa-2 Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit Butyrat (1mM/L, 2mM/L) und dem p38-Inhibitor SB203580. Repräsentativ ist einer von drei unabhängigen Western Blots dargestellt.



Butyrat (mM/L)	-	-	1	1	2	2
SB203580	-	+	-	+	-	+

Abbildung 3.8d Quantifizierung des VEGF Proteins im Gesamthomogenat aus MIA-PaCa-2 Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit Butyrat (1mM/L, 2mM/L) und dem p38-Inhibitor SB203580. Der Western Blot aus Abbildung 3.7a wurde densitometrisch ausgewertet und im Verhältnis zu β -Actin quantifiziert.

Nach 48 Stunden Inkubation von MIA-PaCa-2 Zellen mit Butyrat (1mM/L, 2mM/L) und dem spezifischen p38-Inhibitor SB203580 lässt sich in **Abbildung 3.8c** sowohl für die Kontrolle als auch für beide Konzentrationen von Butyrat eine Zunahme der Expression des VEGF Proteins im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle erkennen. Dabei war die Steigerung für Butyrat (1mM/L) nach 48 Stunden Inkubation am stärksten.

Abbildung 3.8d zeigt die densitometrische Auswertung dieses Western Blots: Bei alleiniger Behandlung mit SB203580 stieg VEGF auf 215 % der Kontrolle an. Die Steigerung der Proteinexpression von VEGF nach Behandlung mit Butyrat (1mM/L) und SB203580 lag bei 196 % im Vergleich zur alleinigen Behandlung der MIA-PaCa-2 Zellen mit Butyrat (1mM/L) (160 %). Eine Inkubation der Zellen mit Butyrat (2mM/L) und SB203580 zeigte nach 48 Stunden einen Anstieg auf 156 % im Vergleich zur Behandlung einzig mit Butyrat (2mM/L) (137 %).

4 DISKUSSION

Die in dieser Arbeit dargelegten Ergebnisse zeigen die Wirkung des noch wenig bekannten Histondeacetylaseinhibitors (HDI) α -Liponsäure im Vergleich zu den HDIs Butyrat, Valproat und Trichostatin A in der humanen Pankreaskarzinomzelllinie MIA-PaCa-2, welche als Modell für die Untersuchungen der vorliegenden Arbeit diene.

Neben dem Einfluss auf die für das Tumorwachstum bedeutende Zellzahl und die Proliferation der Zellen wurde die vergleichende Wirkung der HDAC-Inhibitoren auf die Synthese des für die Tumorangiogenese wichtigsten proangiogenen Faktors, des *vascular endothelial growth factor* (VEGF), aufgezeigt. Weiterhin wurde die HDAC-Wirkung auf den Angiogenese-relevanten Transkriptionsfaktor *hypoxia inducible factor - 1 α* (HIF-1 α) beschrieben. Die diesen Vorgängen möglicherweise zugrunde liegenden und durch die verschiedenen HDACs beeinflussten Wirkmechanismen wurden im Anschluss untersucht. Hierbei sind der Vitamin D Rezeptor (VDR) sowie der p38 - *mitogen-activated-protein-kinase* (MAPK) - Regulationsweg von Bedeutung.

Zusammenfassend ist die Hemmung des Tumorwachstums und der tumorinduzierten Angiogenese im Pankreaskarzinom durch Histondeacetylaseinhibitoren ein noch unzureichend erforschtes Gebiet. Insbesondere liegen bezüglich der antiangiogenen Wirkung von α -Liponsäure nur wenige Erkenntnisse vor.

4.1 HDI – Wirkung auf Zellzahl und Proliferation von MIA-PaCa-2

Es wurde in MIA-PaCa Zellen der Einfluss der verschiedenen HDAC-Inhibitoren auf die Zellzahl und somit auf das Tumorwachstum nach 24-stündiger sowie nach 48-stündiger Inkubation untersucht. Im Vergleich zur Kontrolle kam es bei Behandlung mit allen hier verwendeten HDAC-Inhibitoren zu einer Abnahme der Zahl der Zellen zu beiden Zeitpunkten. Eine hochsignifikante Reduktion der Zellzahl zeigte sich mit zunehmender Konzentration nach Behandlung mit dem HDI α -Liponsäure, wobei die Hemmung nach 24 Stunden deutlich stärker ausgeprägt war. Neben dem Einfluss auf die Anzahl der Zellen, spielt auch deren Proliferationsfähigkeit eine bedeutende Rolle, sowohl für das Tumorwachstum wie auch für die tumorinduzierte Angiogenese (siehe Kap. 1.3.1 und 1.3.3.2). Die vorliegenden Ergebnisse ließen nach 24-stündiger sowie 48-stündiger Inkubation mit α -Liponsäure sowie mit Butyrat, Valproat und Trichostatin A eine

konzentrationsabhängige Hemmung der Zellproliferation erkennen. Der HDI α -Liponsäure zeigte hierbei eine hochsignifikante Proliferationsinhibition der MIA-PaCa-2 Zellen, wobei die stärkste Wirkung nach 48 Stunden bei (5mM/L) α -Liponsäure zu beobachten war. Für α -Liponsäure existieren keine vergleichbaren Studien, während die Hemmwirkungen von Butyrat, Valproat und TSA in unserer Arbeitsgruppe von Becker *et al.* [17] untersucht wurde. Alle drei HDIs reduzierten in Versuchen die Proliferation in HUVECs (*human umbilical vein endothelial cells*) dosisabhängig und hochsignifikant. Eine Hemmung der Zellproliferation in der Kolonkarzinomzelllinie CaCo-2 durch Valproat und TSA wurde in Untersuchungen von Becker *et al.* (2005) erstmals demonstriert und konnte in der vorliegenden Arbeit auch an MIA-PaCa-2 Zellen gezeigt werden. Die Wirkung des HDI Butyrat konnte in unserer Arbeitsgruppe schon in einer früheren Studie von Zgouras *et al.* (2002) nachgewiesen werden. Vergleichbar mit der Wirkung von Butyrat auf die Zellproliferation von MIA-PaCa-2 Zellen hemmte dieser HDI in der Arbeit von Zgouras *et al.* die HUVEC-Zellproliferation signifikant nach Inkubation mit konditionierten Medien von mit Butyrat behandelten Kolonkarzinomzellen (Caco-2) [42]. Der hemmende Einfluss des HDIs α -Liponsäure auf die Zellzahl und die Zellproliferation in MIA-PaCa-2 Zellen konnte in dieser Arbeit erstmals dargestellt werden.

4.2 Funktion von VEGF

Angiogenesehemmung durch HDAC-Inhibitoren wurde unter anderem von Deroanne *et al.* (2002) an HUVECs beschrieben. Die VEGF-induzierte Gefäßformation konnte in dieser Arbeit durch TSA und *suberoylanilide hydroxamic acid* (SAHA) unterbunden werden. Die Abnahme der HDAC Aktivität mit Hilfe verschiedener Inhibitoren steuert laut Deoranne die Differenzierung von normalen und malignen Zellen [88]. Eine Hemmung von HDACs konnte weiterhin bei verschiedenen Krebszellen zur Apoptose führen [89] und verursachte dadurch beispielsweise eine signifikante Abnahme des Tumorwachstums bei Nacktmäusen mit humanem Prostatakarzinom [21]. Die hemmende Wirkung von TSA und SAHA in *in vivo* Studien befürwortete diese HDAC-Inhibitoren als mögliche therapeutische antiangiogenetische Wirkstoffe [21,90]. In unserer Arbeitsgruppe konnte an der humanen Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 eine hochsignifikante Reduktion der VEGF Sekretion und Expression nach Behandlung mit den HDAC-Inhibitoren Valproat, Butyrat und Trichostatin A gezeigt werden, wobei TSA den am stärksten hemmenden Einfluss hatte [17].

Diese HDIs wurden auch in der vorliegenden Arbeit im Vergleich zu α -Liponsäure bezüglich der Angiogenesehemmung in MIA-PaCa-2 Zellen untersucht. Bereits 2003 wies unsere Arbeitsgruppe die reduzierte Synthese von VEGF in Caco-2 Zellen nach Behandlung mit dem HDAC-Inhibitor Butyrat nach [42]. 1993 wurde Butyrat von Hague *et al.* wegen seiner Fähigkeit der Apoptoseinduktion als antiangiogene Substanz in der kolorektalen Karzinogenese dargestellt [91]. Unter anderem bestätigte Pellizzaro *et al.* (2002) diese antiangiogene Wirkung in Untersuchungen an der Kolonkarzinomzelllinie HT29 [92].

In Analogie zu diesen vorherigen Untersuchungen ließ sich in dieser Arbeit erstmals der Einfluss verschiedener HDIs auf die Synthese von VEGF in den humanen Pankreaskarzinomzellen MIA-PaCa-2 darstellen. Die VEGF Sekretion in dieser Zelllinie nach Behandlung mit α -Liponsäure, Butyrat, Valproat und Trichostatin A wurde konzentrationsabhängig nach 24-stündiger und 48-stündiger Inkubation mit allen Behandlungssubstanzen reduziert. Besonders nach 48 Stunden wurde die VEGF Sekretion hochsignifikant für α -Liponsäure sowie für TSA gehemmt. Im Vergleich mit den anderen HDIs zeigte α -Liponsäure nach 24 Stunden Inkubation die am stärksten hemmende Wirkung auf die Sekretion des VEGF-Proteins.

Die Expression von VEGF auf Proteinebene wurde im Western Blot nach 48 Stunden Inkubation mit α -Liponsäure vergleichend zu Butyrat getestet. In den hier vorgestellten Untersuchungen zeigten sich α -Liponsäure sowie Butyrat als potente Hemmstoffe der VEGF Expression. α -Liponsäure war hierbei deutlich stärker wirksam als der bekanntere HDI Butyrat. Butyrat selbst war in einer Konzentration von (1mM/L) stärker wirksam als in einer Konzentration von (2mM/L).

Die Abnahme der Sekretion als auch der Expression des VEGF Proteins durch HDAC-Inhibitoren ist somit auch für die humane Pankreaskarzinomzelllinie MIA-PaCa-2 ein interessanter Ansatz für die Hemmung von Angiogenese und somit Wachstum des Pankreaskarzinoms.

4.3 HIF-1 α und HDAC-Inhibitoren

Wie in Kapitel 1.3.5 beschrieben, wird der *hypoxia inducible factor* (HIF-1 α) physiologischerweise unter normoxischen Bedingungen über das Ubiquitin-Proteasomen-System abgebaut, während Hypoxie zur Stabilisierung von HIF-1 α und folglich dessen Akkumulation im Zytosol führt [74,78]. Dort kommt es zur Translokation dieses Transkriptionsfaktors in den Nukleus und anschließenden Bildung eines aktiven Komplexes mit dem dort vorhandenen HIF-1 β [78], während physiologisch geringe Konzentrationen von HIF-1 α keine Heterodimerbildung mit HIF-1 β und somit keine Aktivierung der Transkription bewirken können [74]. Die unter normoxischen Bedingungen vorhandenen geringen Konzentrationen an HIF-1 α gewährleisten laut Iyer *et al.* (1998) die Genexpression, die für die Energieproduktion und die Aufrechterhaltung normaler Zellfunktionen nötig ist [93].

In einer Studie über die Angiogenese kolorektaler Adenokarzinome wird postuliert, dass HIF-1 α die VEGF-Expression reguliert und somit die Tumorneovaskularisation entscheidend beeinflusst. Die HIF-1 α Proteinexpression korrelierte hier signifikant mit der VEGF Proteinexpression und der Gefäßdichte in kolorektalen Karzinomen. HIF-1 α ist laut dieser Arbeit somit für die VEGF Regulation von Bedeutung und nimmt dadurch Einfluss auf Tumorangiogenese und Tumorprogression [94]. Auch Kuwai *et al.* (2003) beschrieben einen Zusammenhang von HIF-1 α und von VEGF mit der Angiogenese in Zellkultur wie auch im Bioplat in vier verschiedenen Zelllinien humaner kolorektaler Karzinome (COLO320DM, COLO201, DLD-I, WiDr). Die Prognose für Patienten, die an einem Kolonkarzinom erkrankt waren, korrelierte nach Untersuchungen dieser Arbeitsgruppe ebenfalls mit HIF-1 α und VEGF. Sie war deutlich schlechter für Patienten, die eine hohe HIF-1 α Expression in den Tumorzellen aufwiesen, da diese zur Induktion der Angiogenese und folglich Tumorprogression über eine Regulation von VEGF führte [95].

Die über HIF-1 α stimulierte VEGF-induzierte Vaskularisierung maligner Tumore wurde desweiteren wiederholt nachgewiesen. Verschiedene Arbeitsgruppen beschrieben die Expressionsrate von HIF-1 α hierbei als aussagekräftig für den Grad der Vaskularisation [96-98]. In einer Studie von Shibaji *et al.* (2003) an Patienten, die an einem Pankreaskarzinom erkrankt waren, wurde nachgewiesen, dass es im Verlauf der Erkrankung zur verstärkten Expression von HIF-1 α kommt. Diese Arbeitsgruppe postulierte, dass durch den Anstieg des Transkriptionsfaktors sowohl die Neovaskularisation und dadurch auch Progression des Pankreaskarzinoms induziert wird [77].

Auch B chler *et al.* (2003) postulierten diese positive Korrelation für das Pankreaskarzinom. In einer humanen Pankreaskarzinomzelllinie wurde *in vitro* und *in vivo* der Zusammenhang zwischen Hypoxie und VEGF Produktion wie auch Neovaskularisation im Pankreaskarzinom über HIF-1 α beschrieben [99]. Eine andere Studie von B chler *et al.* (2004) zeigte eine reduzierte VEGF Genexpression auf, reguliert über eine Hemmung von HIF-1 α in Pankreastumorzellen durch die antiangiogenetischen Eigenschaften des Isoflavonoids Genistein [100].

In Anlehnung an diese Untersuchungen stellt sich die Frage, wie die HIF-1 α Expression weiterhin effektiv inhibiert und somit die tumorinduzierte Angiogenese und dadurch das Wachstum eines Tumors gehemmt werden könnte.

Lee *et al.* (2003) berichteten über die Hemmung der HIF-1 α Funktion durch spezifische zelltypische Faktoren, die möglicherweise HDAC-Aktivität besitzen, was durch Versuche mit HDAC-Inhibitoren erkannt wurde [101-102]. In unserer Arbeitsgruppe wurde die Wirkung der HDAC-Inhibitoren Butyrat, Valproat und Trichostatin A auf die Expression von HIF-1 α im Zelllysate von Kolonkarzinomzellen (Caco-2) untersucht. Entgegen der vorherigen Daten konnte eine zeit- und dosisabhängig gesteigerte Proteinexpression nach Behandlung mit allen drei Substanzen verzeichnet werden [17].

Diese Ergebnisse decken sich mit den Daten der vorliegenden Arbeit: der HDAC-Inhibitor Butyrat induziert in MIA-PaCa-2 Zellen wie in Caco-2 Zellen ebenfalls dosisabhängig eineverst rkte HIF-1 α Expression. Auch der noch weitgehend unbekannt HDI α -Liponsäure zeigt eine konzentrationsabhängige Zunahme der Expression von HIF-1 α , die verglichen mit Butyrat noch deutlich stärker ist.

Dies erscheint zunächst - verglichen mit den vorherigen Aussagen - nicht stimmig. Ebenso die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse der verwendeten HDAC-Inhibitoren auf die Synthese von VEGF scheinen hierzu widersprüchlich. In einer Arbeit von Pellizzaro *et al.* (2002) wurden jedoch teilweise ähnliche Ergebnisse erzielt. Nach Behandlung mit dem HDAC-Inhibitor Butyrat wurde in der Kolonkarzinomzelllinie HT-29 eine Hemmung der Sekretion von VEGF trotz Steigerung der Expression von HIF-1 α festgestellt [103]. Becker *et al.* (2005) untersuchte in diesem Zusammenhang auch die nukleäre Aktivität von HIF-1 α im Zelllysate von CaCo-2 Zellen, die durch die eingesetzten HDAC-Inhibitoren reduziert wurde [17]. Frühere Untersuchungen unserer Arbeitsgruppe mittels Immunfluoreszenz zeigten, dass nach Inkubation mit Butyrat eine Akkumulation von HIF-1 α im Zytoplasma von Kolonkarzinomzellen stattfand, während der Proteingehalt im Zellkern allerdings deutlich reduziert vorlag [42].

Aufgrund dieser Versuchsergebnisse wird postuliert, dass durch Behandlung mit HDAC-Inhibitoren die Translokation des HIF-1 α Proteins in den Nukleus unterbunden wird, dadurch keine Heterodimerbildung mit HIF-1 β (wie in Kap. 1.3.5 beschrieben) möglich ist und somit Transkription und Genexpression gehemmt werden. Die Mechanismen der nukleären Translokation des HIF-1 α Proteins sind unklar. Mögliche Erklärungsansätze könnten sein, dass der Prozess induziert wird aufgrund von Hypoxie [104] oder aber um eine proteasomale Degradation des Proteins zu vermeiden [105,106].

Die Zunahme von HIF-1 α im Zelllysat der MIA-PaCa-2 Zellen unter Behandlung mit α -Liponsäure oder Butyrat bei gleichzeitiger Inhibition der VEGF-Synthese könnte auch für diese Arbeit durch eine HDAC-bedingte Hemmung der nukleären Translokation des Transkriptionsfaktors zu begründen sein.

4.4 Mögliche Wirkmechanismen der HDAC-Hemmung

4.4.1 VDR-Expression

Wie in vielen Untersuchungen beschrieben, kann der Vitamin D Rezeptor (VDR) sowie sein natürlicher Agonist 1,25-Dihydroxycholecalciferol (1,25(OH) $_2$ D $_3$) in verschiedenen Krebszelllinien nachgewiesen werden und antineoplastische Wirkungen auf eine Vielzahl tumoröser Zellen zeigen [34,36,79,80,107]. Wachstumshemmende und differenzierungsfördernde Effekte von 1,25(OH) $_2$ D $_3$ wurden schon in einer Vielzahl verschiedener Zelltypen nachgewiesen [36,108-110]. Über eine Bindung an den VDR wird die Transkription von Genen reguliert, die beteiligt sind an DNA-Replikation, Apoptose und Differenzierung (siehe Kap. 1.3.6).

1,25(OH) $_2$ D $_3$ hemmt nachweislich die Angiogenese *in vitro* und *in vivo*. *In vitro* konnte die dosisabhängige, signifikante Hemmung der VEGF-induzierten endothelialen Zellsprossung und Elongation gezeigt werden, sowie die signifikante, wenn auch geringgradige, Hemmung der VEGF-induzierten endothelialen Zellproliferation. *In vivo* wurde im Tierversuch anhand von Brustkarzinomzellen eine reduzierte Vaskularisation des Tumors nach Behandlung mit 1,25(OH) $_2$ D $_3$ festgestellt [111].

Die Wirkung des VDR unter Einfluss von HDAC Hemmstoffen wurde erstmals in einer Studie von Gaschott *et al.* (2001) beschrieben. Unsere Arbeitsgruppe konnte nachweisen, dass der HDAC-Inhibitor Butyrat zusammen mit $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ in Kolonkarzinomzellen synergistisch wirkt, dadurch verstärkt das Zellwachstum inhibiert und zur Induktion der Differenzierung führt. Dies konnte in weiteren Untersuchungen auch für andere neoplastische Zelllinien bestätigt werden [36,112-114]. Laut Gaschott *et al.* (2001, 2003) steigert Butyrat die Expression von VDR auf Protein- und mRNA-Ebene. Die antineoplastischen Effekte konnten bei Fehlen des VDR bzw. Einsatz des spezifischen VDR-Antagonisten ZK 191732 nicht beobachtet werden [27,66]. Diese Ergebnisse decken sich mit denen der vorliegenden Arbeit nach Behandlung der Pankreaskarzinomzelllinie MIA-PaCa-2 mit dem HDI Butyrat.

Wächtershäuser *et al.* (2001) zeigten, dass Butyrat und $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zu einer hochsignifikanten Steigerung der $p21^{\text{Waf1/Cip1}}$ – und $p27^{\text{Kip1}}$ -Expression führen. $p21^{\text{Waf1/Cip1}}$ ist hierbei bedeutsam für die Differenzierung der Zellen durch Butyrat, während $p27^{\text{Kip1}}$ an der Induktion der Apoptose beteiligt ist [115]. Butyrat führte in der Arbeit von Gaschott *et al.* zum Anstieg der $p21^{\text{Waf1/Cip1}}$ -Expression, Butyrat und $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ steigerten diese synergistisch, während unter Verwendung eines VDR-Antagonisten keine Änderung zur Kontrolle festzustellen war. Die Hypothese, dass die Differenzierung von Kolonkarzinomzellen durch Butyrat induziert wird über eine gesteigerte Expression des Vitamin D Rezeptors, gefolgt von einer Stimulation des Negativzellregulators $p21^{\text{Waf1/Cip1}}$, wurde somit in dieser Arbeit belegt [34,80].

Schon 1998 zeigten Archer *et al.* die wachstumshemmenden Effekte von Butyrat auf, die laut Archer hauptsächlich auf eine gesteigerte Expression von $p21^{\text{Waf1/Cip1}}$ zurückzuführen sind [116]. In weiteren Untersuchungen von Gaschott *et al.* (2001) konnte die selektive Steigerung der $p21^{\text{Waf1/Cip1}}$ -Expression über den durch Butyrat induzierten Anstieg von VDR bestätigt werden. Während in dieser Arbeit Butyrat sowie auch $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zu einem Anstieg von $p21^{\text{Waf1/Cip1}}$ sowie $p27^{\text{Kip1}}$ führten, ergab die kombinierte Behandlung von Kolonkarzinomzellen mit Butyrat und $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ zusammen eine synergistische Steigerung von $p21^{\text{Waf1/Cip1}}$, aber nicht von $p27^{\text{Kip1}}$ [36]. Dass die Butyrat-induzierte Differenzierung und Einleitung der Apoptose in Caco-2 Zellen mit der Induktion von $p21^{\text{Waf1/Cip1}}$ sowie $p27^{\text{Kip1}}$ in Verbindung steht, wurde in Arbeiten von Litvak *et al.* (1998) und Wang *et al.* (1998) ebenfalls postuliert [36,117,118].

Während für die Wirkung des HDI Butyrat und VDR bzw. $1,25(\text{OH})_2\text{D}_3$ einige wenige Daten vorliegen, gibt es für α -Liponsäure noch keine vergleichbaren Untersuchungen. Es konnte einzig in Anlehnung an die Arbeit von Wächtershäuser *et al.* (2001) in einer Untersuchung von van de Mark *et al.* (2003) gezeigt werden, dass α -Liponsäure in nicht-transformierten Zelllinien zu einem Anstieg von p27^{Kip1} führt, was wiederum einen Zellzyklusarrest in der G₀/G₁-Phase bedingt [25,115]. Ob die p27^{Kip1} Expression jedoch von α -Liponsäure und VDR zusammen synergistisch gesteigert werden könnte, ist nicht bekannt. Auch in der Arbeit von Mark *et al.* (2003) wird die Wirkung des HDI α -Liponsäure mit der von Butyrat verglichen. Laut diesen Untersuchungen ist der Zellzyklusarrest bedingt durch α -Liponsäure reversibel, während eine Behandlung mit dem HDI Butyrat den Zellzyklus sowohl in transformierten als auch in nicht-transformierten Zelllinien nicht-reversibel stoppt. Die Behandlung mit α -Liponsäure in verschiedenen humanen Tumorzelllinien führte zur Induktion der Apoptose [25].

Untersuchungen des Vitamin D Rezeptors im humanen Pankreaskarzinom sind bis jetzt wenig bekannt. Eine Studie von Kisker *et al.* (2003) beschreibt die Wirkung eines Vitamin D bindenden Protein-Makrophagen Aktivierungsfaktor (DBP-maf) auf eine humane Pankreaskarzinomzelllinie. In *in vivo* Studien an Mäusen konnte festgestellt werden, dass DBP-maf als ein antiangiogenetisches Molekül antiproliferativ auf Endothelzellen wirkt sowie Makrophagen stimuliert, was wiederum das Wachstum von humanem Pankreaskrebs hemmen und in hohen Dosen zur Tumorregression führen kann [119].

Um zu untersuchen, ob der Vitamin D Rezeptor auch für die humane Pankreaskarzinomzelllinie MIA-PaCa-2 von Bedeutung ist, wurde das VDR-Protein in der vorliegenden Arbeit nach Behandlung von MIA-PaCa-2 Zellen mit α -Liponsäure im Vergleich zu Butyrat quantifiziert. Der HDAC-Inhibitor α -Liponsäure bewirkte nach 12 Stunden eine deutliche Zunahme der VDR-Expression in MIA-PaCa-2. Hierzu vergleichbare Ergebnisse existieren bis jetzt für keine andere Zelllinie.

In Analogie zu den Studien unserer Arbeitsgruppe an der Kolonkarzinomzelllinie CaCo-2 [34,36] zeigten auch MIA-PaCa-2 Zellen eine Zunahme der VDR Expression nach Behandlung mit dem HDAC-Inhibitor Butyrat. Während nach 12 Stunden Inkubation eine deutlichere Steigerung von VDR nach Behandlung mit Butyrat (1mM/L) zu verzeichnen war, war die VDR Zunahme nach 24 Stunden für Butyrat (2mM/L) stärker. Die Ergebnisse lassen vermuten, dass der Vitamin D Rezeptor auch in der humanen Pankreaskarzinomzelllinie MIA-PaCa-2 zumindest teilweise an den durch HDAC-Inhibitoren vermittelten Effekten beteiligt ist.

Dies könnte auch in MIA-PaCa-2 Zellen über den p21^{Waf1/Cip1}-Regulationsweg möglich sein. Die durch die HDAC-Inhibitoren α -Liponsäure und Butyrat vermittelten antineoplastischen Effekte konnten auch in dieser Zelllinie effektiv durch VDR verstärkt werden. Durch die breite Verteilung des Vitamin D Rezeptors im menschlichen Körper kann Vitamin D grundsätzlich als nützlicher Wirkstoff in der Behandlung von Tumorerkrankungen eingesetzt werden. Da pharmakologische Konzentrationen dieses Hormons nötig sind um antineoplastische Effekte zu erreichen und somit hyperkalzämische Nebenwirkungen zu erwarten wären, könnten Medikamentenkombinationen wie beispielsweise Vitamin D mit Butyrat sinnvolle Alternativen darstellen [80]. Eine weitere Möglichkeit der Reduktion hyperkalzämischer Nebeneffekte wird in einer Studie von Finlay *et al.* (2001) beschrieben. Im Tierversuch wurde neben der systemisch intravenösen die direkte hepatisch arterielle Gabe von 1,25(OH)₂D₃ untersucht. Während die 1,25(OH)₂D₃ – Serumkonzentration der Tiere mit hepatisch arterieller Infusion im Normalbereich lag, konnte in der Vergleichsgruppe mit intravenöser Infusion sowohl eine erhöhte Konzentration von 1,25(OH)₂D₃ im Serum als auch eine deutliche Hyperkalzämie verzeichnet werden. Somit könnte diese Form der Applikation höhere Dosen an 1,25(OH)₂D₃ bei reduzierten Nebeneffekten ermöglichen [120].

Diese Ansatzpunkte könnten auch in der Behandlung von Pankreaskarzinomen zum Einsatz kommen. Neben dem bekannteren HDI Butyrat kann dabei die Verwendung von α -Liponsäure eine interessante Rolle spielen.

4.4.2 p38- und pp38-Expression

Wie in Kapitel 1.3.7 dargelegt, sind Mitogen-aktivierte Proteinkinasen (MAPKs) in die Regulation von Zellfunktionen involviert. Diese Signalkaskaden können spezifische zelluläre Effekte induzieren, unter anderem Zellteilung, Zellproliferation, Zelldifferenzierung oder Apoptose von Zellen [121-125]. MAPKs erhalten ihre volle Aktivität nach zweifacher Phosphorylierung [81].

In der humanen Kolonkarzinomzelllinie CaCo-2 wurde in unserer Arbeitsgruppe bereits von Daniel *et al.* (2004) die Bedeutung der MAPK-Signalkaskade in der Butyrat-induzierten Expression des Vitamin D Rezeptors und der Differenzierung von CaCo-2 Zellen nachgewiesen. Daniel *et al.* (2004) postulierten eine durch Butyrat induzierte p38-MAPK-Aktivierung, die zur VDR Expression und dadurch Zelldifferenzierung von CaCo-2 Zellen führte [38]. Daten zu α -Liponsäure existierten hierzu bisher nicht.

In der vorliegenden Arbeit wurde mittels Western Blot die Expression des p38-Proteins sowie der phosphorylierten Form (pp38) nach Behandlung von MIA-PaCa-2 Zellen mit α -Liponsäure im Vergleich zu Butyrat untersucht. Zur weiteren Charakterisierung des MAPK-Signalweges wurde der p38-Inhibitor SB203580 eingesetzt. Dieser Hemmstoff der p38 MAPK unterdrückt die Aktivierung von MAPKAP kinase-2 (MAPK-Substrat, p38 MAPK) und verhindert so die Phosphorylierung des Hitzeschockproteins 27 (Hsp27), das als Antwort auf IL-1, zellulären Stress und bakterielles Endotoxin *in vivo* gebildet wird. Dagegen werden die MAPK-Homologe JNK oder p42 MAPK durch SB203580 nicht beeinflusst [126]. Auch Ogborne *et al.* (2005) konnten eine Verbindung von α -Liponsäure und dem p38-MAPK Signaltransduktionsweg nachweisen. Ihre Untersuchungen ergaben, dass α -Liponsäure die HO-1 (*heme oxygenase-1*) Expression in humanen Monozyten über den p38-MAPK-Signalweg induziert, was durch den spezifischen p38-Inhibitor SB203580 auf mRNA-Ebene gehemmt werden konnte [127].

Die Expression des p38-Proteins in MIA-PaCa-2 Zellen blieb in dieser Arbeit nach 12-stündiger Behandlung mit α -Liponsäure sowie Butyrat mit und ohne Zugabe des spezifischen p38-Inhibitors SB203580 im Vergleich zur Kontrolle unverändert.

Dagegen zeigte eine Behandlung der Pankreaskarzinomzellen mit α -Liponsäure über 12 Stunden eine gesteigerte p38 MAP-Kinase Phosphorylierung, die sich durch gleichzeitige Behandlung der Zellen mit dem p38-Inhibitor SB203580 wieder revertieren ließ. In Übereinstimmung mit α -Liponsäure zeigte Butyrat im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle eine Zunahme der p38-Phosphorylierung nach 12 Stunden Inkubation. Der p38-Inhibitor SB203580 führte dabei stets zur Hemmung der induzierten p38 MAP-Kinase Phosphorylierung.

Nach 24 Stunden Inkubation mit dem HDAC-Inhibitor Butyrat war die p38-Phosphorylierung ebenfalls deutlich erhöht, während sie unter Zugabe von SB203580 reduziert wurde. Die Hemmung durch den spezifischen p38-Inhibitor war nach 24 Stunden Inkubation zeitabhängig stärker.

Diese Ergebnisse lassen auf eine durch α -Liponsäure sowie durch Butyrat induzierte p38-Aktivierung zu pp38 in MIA-PaCa-2 Zellen schließen, was mit den Ergebnissen von Daniel *et al.* (2004) in der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 übereinstimmt [38]. Während sich die p38-Proteinexpression nach Behandlung mit den HDIs nicht veränderte, konnte deren Phosphorylierung nach Zugabe von α -Liponsäure wie auch Butyrat eindeutig gesteigert werden. Diese These wird gestützt durch die spezifische Hemmung der p38-Phosphorylierung nach Einsatz von SB203580, welcher jedoch keinen Einfluss auf die p38-Expression *per se* hatte.

Vergleichbar mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit wiesen Untersuchungen von Witt *et al.* (2000) die Butyrat-induzierte Differenzierung von humanen Leukämiezellen (K562) durch eine Aktivierung des p38-MAPK-Signalweges bei gleichzeitiger Hemmung der ERK-Signalkaskade nach. Es konnte eine Inhibition der Zellproliferation und Induktion der Hb-Synthese in K562-Zellen nach p38-Aktivierung aufgezeigt werden. Der Einsatz von p38-phosphospezifischen Antikörpern führte zur verstärkten Phosphorylierung von p38, während der Einsatz des spezifischen Inhibitors SB203580 eine Hemmung der Phosphorylierung herbeiführte und dadurch die Induktion der Hb-Expression durch Butyrat aufhob [121].

In einer Arbeit von McMillan *et al.* (2003) wurde nachgewiesen, dass Butyrat über eine Aktivierung von p38 zur Apoptose in humanen Kolonadenomzellen führen kann. Auch hier waren die Effekte nach Einsatz des spezifischen p38-Inhibitors SB203580 reduziert [82].

Bei der Regulation des Wachstums von Pankreaskarzinomzellen sind laut Ding *et al.* (2003) weitere Signalwege von Bedeutung [128]. Protein-Tyrosin-Kinasen, MAP-Kinasen, die Phosphatidylinositid (PI)-3-Kinase/Protein Kinase B (AKT)-Kaskade und Protein Kinase C sind von Bedeutung in der Steuerung von Proliferation, Apoptose und Differenzierung der Pankreaskrebszellen [128-133]. Die MAP-Kinasen werden grundsätzlich untergliedert in die p42/44^{MAPK} -, die JNK/SAPK- und die p38-Signalkaskade [128,130,131].

Schwab *et al.* (2006) konnten eine p38-MAPK vermittelte Expression von PPAR γ nach Inkubation mit Butyrat nachweisen. PPAR γ ist ein nuklearer Rezeptor und an zahlreichen physiologischen Prozessen wie der Differenzierung von Zellen beteiligt. In dieser Studie wurde ebenso wie in der vorliegenden Arbeit der p38-Inhibitor SB203580 verwendet [39].

Eine Induktion von PPAR γ über die Aktivierung der p38-MAPK postulieren auch Hata *et al.* (2002). BMP2 (*bone morphogenetic protein 2*) induzierte die Differenzierung von undifferenzierten mesenchymalen Zellen in Adipozyten über eine Induktion der PPAR γ -Expression durch die Steigerung seiner transkriptionellen Aktivität, vermittelt durch eine Aktivierung der p38 Kinase [134].

Wie diese und die vorherigen Ergebnisse dieser Arbeit zeigen, führte der HDI α -Liponsäure sowie auch Butyrat zur verstärkten Expression des VDR. Da diese HDAC-Inhibitoren ebenso eine Zunahme der p38-Phosphorylierung in MIA-PaCa-2 bewirken und ein Zusammenhang des p38-MAPK-Signaltransduktionswegs und der VDR-Expression in Versuchen an Kolonkarzinomzellen nachgewiesen werden konnte, ist auch für diese Pankreaskarzinomzelllinie eine HDAC-vermittelte Induktion der p38-MAPK mit folgender gesteigerter VDR-Expression und anschließender Zelldifferenzierung zu vermuten.

4.5 p38-MAPK-Signalweg und Angiogenese

Zur Klärung der abschließenden Frage, ob eine p38-Aktivierung in MIA-PaCa-2 auch an der VEGF-Synthese beteiligt ist, wurde mittels Western Blot die Expression des VEGF Proteins nach Behandlung von MIA-PaCa-2 Zellen mit α -Liponsäure mit und ohne den spezifischen p38-Inhibitor SB203580 untersucht. Butyrat diente auch hier als Vergleich.

MIA-PaCa-2 Zellen inkubiert mit α -Liponsäure zeigten nach 48 Stunden eine zu erwartende Abnahme der VEGF Expression wie in Kapitel 4.2 beschrieben. Im Gegensatz dazu war die Proteinexpression nach Zugabe des spezifischen p38-Inhibitors SB203580 in den Pankreaskarzinomzellen deutlich höher. Dies lässt eine Verbindung der p38-MAPK-Signalkaskade und der Expression von VEGF vermuten. Auch die Behandlung von MIA-PaCa-2 Zellen mit Butyrat und SB203580 zeigte nach 48 Stunden Inkubation vergleichbare Ergebnisse. Butyrat wies in beiden Konzentrationen eine höhere VEGF-Expression nach Zugabe von SB203580 auf. Dabei war die Wirkung für Butyrat (1mM/L) stärker als für Buyrat (2mM/L).

Diese Ergebnisse zeigen deutlich, dass in der humanen Pankreaskarzinomzelllinie MIA-PaCa-2 die durch die HDAC-Inhibitoren α -Liponsäure sowie Butyrat verursachte Angiogenesehemmung mit dem p38-MAPK-Signaltransduktionsweg in Verbindung steht. Die Hemmung der VEGF-Proteinexpression war nach Behandlung mit α -Liponsäure bzw. Butyrat ohne die Zugabe des p38-Inhibitors SB203580 deutlich stärker.

Dies lässt vermuten, dass auch die HDAC-induzierte Hemmung der VEGF-Proteinexpression in MIA-PaCa-2 über eine Aktivierung des p38-MAPK-Signalweges reguliert wird, was in bisherigen Versuchen weder für α -Liponsäure noch für den weitaus genauer untersuchten HDAC-Inhibitor Butyrat gezeigt werden konnte.

5 ZUSAMMENFASSUNG

Angiogenese ist die wichtigste Voraussetzung für das Wachstum und die Metastasierung eines Tumors, da Sauerstoff und Nährstoffe für das Tumorgewebe bereitgestellt werden. Die Hemmung der Angiogenese kann in der Entwicklung neuer anti-neoplastischer Therapien als eine der vielversprechendsten Forschungsmethoden angesehen werden.

Zunehmend gewinnen Histondeacetylaseinhibitoren (HDIs) auf diesem Gebiet an Bedeutung. Aktuelle Untersuchungen zeigen, dass HDIs antiangiogene Potenz besitzen. In diesem Zusammenhang wurde die Wirkung des neuartigen HDI α -Liponsäure vergleichend zu den bekannten HDIs Butyrat, Valproat und Trichostatin A in der humanen Pankreaskarzinomzelllinie MIA-PaCa-2 untersucht. Die Ergebnisse zeigen, dass α -Liponsäure als ein wirkungsvoller HDI angesehen werden kann und in die tumorzellinduzierte Angiogenese und das Tumorwachstum von MIA-PaCa-2 Zellen eingreift.

Dies zeigte zum einen Untersuchungen von Zellzahl und Proliferation von MIA-PaCa-2 Zellen nach Inkubation mit α -Liponsäure, Butyrat, Valproat und Trichostatin A. Alle HDIs hemmten dosisabhängig und weitgehend signifikant direkt die Zahl und die Proliferation der Pankreaskarzinomzellen. Nach der Proliferation von Zellen kommt es zu deren Differenzierung und zur Bildung neuer Blutgefäße. Angiogenetische Wachstumsfaktoren wie der *vascular endothelial growth factor* (VEGF) wurden hierbei in vielen humanen Krebszelllinien als Angiogenese-induzierend beschrieben. VEGF wird unter hypoxischen Bedingungen reguliert über den *hypoxia inducible factor 1 α* (HIF-1 α). In der vorgestellten Arbeit nahm die VEGF Sekretion dosisabhängig und meist signifikant nach Behandlung mit allen HDIs ab. Die Expression des VEGF Proteins zeigte für die HDIs α -Liponsäure und Butyrat eine Abnahme, während die Expression des HIF-1 α Proteins zunahm. Anhand dieser Ergebnisse kann die vermutete antiangiogene Wirkung der vorgestellten HDIs über eine Hemmung des proangiogenen Faktors VEGF bestätigt werden. Diese Wirkung könnte über eine Hemmung der nukleären Translokation von HIF-1 α zu erklären sein, da die Ergebnisse eine verstärkte Expression des Transkriptionsfaktors im Zytoplasma nach Behandlung mit den HDIs α -Liponsäure und Butyrat zeigten.

In Anlehnung an diese Ergebnisse kann die Hypothese aufgestellt werden, dass HDIs HIF-1 α beeinflussen und somit auch den für die Angiogenese bedeutenden Faktor VEGF, der wiederum über HIF-1 α reguliert wird.

Weiterhin wurde der Einfluss des Vitamin D Rezeptors (VDR) in MIA-PaCa-2 Zellen untersucht. VDR hemmt die Angiogenese *in vitro* und *in vivo*. Nach Behandlung mit den

HDIs α -Liponsäure und Butyrat kam es zu einer gesteigerten Expression von VDR und somit synergistischen Verstärkung der Wirkung in MIA-PaCa-2. Um die Rolle der *mitogen-activated protein kinases* (MAPKs) in der HDI-gesteuerten Zelldifferenzierung und VDR-Expression zu beurteilen, wurde der spezifische MAPK-Inhibitor SB203580 verwendet.

Die vorliegenden Ergebnisse machen deutlich, dass die verwendeten HDAC-Inhibitoren zu einer Phosphorylierung der p38 MAPK und dabei möglicherweise einer Zunahme der VDR Expression und Zelldifferenzierung führen, wohingegen eine Hemmung der p38 MAPK die p38-Phosphorylierung reduziert.

Zum Schluss konnte gezeigt werden, dass der p38 MAPK Signalweg bei den Pankreaskarzinomzellen in die Kontrolle der VEGF Synthese involviert ist. Die Ergebnisse bestätigen eine Hemmung der VEGF Proteinexpression in MIA-PaCa-2 nach Behandlung mit α -Liponsäure und Butyrat während diese Wirkung unter Verwendung des spezifischen p38 MAPK Inhibitors SB203580 nicht zu beobachten war.

6 SUMMARY

Angiogenesis is essential for tumour growth and metastasis, because it provides oxygen and nutrients to the tumour tissue. Inhibition of angiogenesis is considered to be one of the most promising strategies in the development of novel anti-neoplastic therapies.

Histone deacetylase inhibitors (HDIs) has gained importance in recent studies and also has been shown to be a potent antiangiogenic agent. Recent examinations show that HDIs are potent antiangiogenic agents.

In this context the effects of α -lipoic acid, a novel inhibitor of histone deacetylases, compared with the well-known HDIs (butyrate, valproate and trichostatin A) in human pancreatic carcinoma cells (MIA-PaCa-2) is studied. The results indicate that α -lipoic acid is an effective HDI and impairs the tumour cell induced angiogenesis and tumour growth of MIA-PaCa-2 cells.

The above finding was shown first in examinations of cell count and proliferation of MIA-PaCa-2 cells after incubation with α -lipoic acid, butyrate, valproate and trichostatin A. All HDIs inhibited directly cell count and proliferation of pancreatic carcinoma cells, most significantly in a dose-dependent manner. After their proliferation, tumour cells differentiate to form a new vessel. Angiogenic growth factors such as the vascular endothelial growth factor (VEGF) have been observed in many human cancer cell lines inducing angiogenesis. Regulated by hypoxia the VEGF gene is under the control of the hypoxia inducible factor 1 α (HIF-1 α). In the present work a dose-dependent and most significantly decreased secretion of VEGF after treatment with HDIs is shown. The expression of the VEGF protein was reduced while that of the HIF-1 α protein expression increased after HDI treatment. On basis of these results we conclude, that the antiangiogenic effects of the tested HDIs are caused by the inhibition of the proangiogenic factor VEGF. This effect could be explained by inhibiting the HIF-1 α nuclear translocation, as the results showed enhanced cytoplasmic expression of the transcription factor after incubation with α -lipoic acid and butyrate. Summarizing these findings hypothesize, that HDIs influence HIF-1 α and subsequently the angiogenesis related factor VEGF, regulated by HIF-1 α .

Furthermore the influence of the vitamin D receptor (VDR) in MIA-PaCa-2 cells is studied. VDR inhibits angiogenesis both in vitro and in vivo. After treatment with HDIs, α -lipoic acid and butyrate, an upregulation of VDR and synergistic amplification of the effect in MIA-PaCa-2 could be observed. To assess the role of mitogen-activated protein kinases (MAPKs) in HDI-mediated cell differentiation and VDR-expression the specific p38 MAPK inhibitor SB203580 was used.

The present study revealed that the tested HDIs cause phosphorylation of p38 MAPK and thereby possibly upregulation of VDR expression and cell differentiation, whereas inhibition of p38 MAPK abolishes the p38-phosphorylation.

In conclusion, we demonstrated that p38 MAPK pathway is involved in the synthesis of VEGF in pancreatic carcinoma cells. The findings also confirm the inhibition of VEGF protein expression in MIA-PaCa-2 after treatment with α -lipoic acid and butyrate while these effects were not observed using the specific p38 MAPK inhibitor SB203580.

7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Jemal,A., Siegel,R., Ward,E., Hao,Y., Xu,J., Murray,T., Thun,M.J. (2008) Cancer Statistics. *CA Cancer J.Clin.*, 58, 71-96.
2. Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (2006) Krebs in Deutschland, Häufigkeiten und Trends. 5. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe.
3. Schneider,G., Siveke,J.T., Eckel,F., Schmid,R.M. (2005) Pancreatic Cancer: Basic and Clinical Aspects. *Gastroenterology*, 128, 1606-1625.
4. Interdisziplinäre Leitlinie Pankreaskarzinom. Projektgruppe gastrointestinale Tumoren. 1. Auflage. 2002. Tumor Zentrum Berlin.
5. Meyer,R. (2002) Pankreaskarzinom: Kombination von Diagnoseverfahren verbessert das Staging. *Deutsches Ärzteblatt*, 99, 3.
6. <http://www.medicoconsult.de/Gastrobook/Pankrca.php>
7. Das Pankreaskarzinom. Empfehlungen für eine standardisierte Diagnostik, Therapie und Nachsorge. 2. Auflage. 1996. Tumorzentrum Heidelberg/Mannheim.
8. Bauchspeicheldrüsenkarzinom (Pankreaskarzinom). Informationen aus dem PDQ für Patienten. Art. 200046. 2002. Universitätsklinik Bonn.
9. Wray,C.J., Ahmad,S.A., Matthews,J.B., Lowy,A.M. (2005) Surgery for Pancreatic Cancer: Recent Controversies and Current Practice. *Gastroenterology*, 128, 1626-1641.
10. Storniolo,A.M., Enas,N.H., Brown,C.A., Voi,M., Rothenberg,M.L., Schilsky,R. (1999) An investigational new drug treatment program for patients with gemcitabine: results for over 3000 patients with pancreatic carcinoma. *Cancer*, 85, 1261–1268.

11. Kim,M.S., Kwon,H.J., Lee,Y.M., Baek,J.H., Jang,J.-E., Lee,S.-W., Moon,E.-J., Kim,H.-S., Lee,S.-K., Chung,H.-Y., Kim,C.W., Kim,K.-W. (2001) Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes. *Nat.Med.*, 7 (4), 437-443.
12. Blaheta,R., Cinatl,J. (2002) Anti-tumor mechanisms of valproate: a novel role for an old drug. *Med.Res.Rev.*, 22, 492-511.
13. Ottmann,O.G. (2002) Signaltransduktionsmodulatoren - Neue Substanzen zur Therapie von Leukämien. Universität Frankfurt am Main, 4, 1-6.
14. Strimpakos,A., Saif,M.W., Syrigos,K.N. (2008) Pancreatic cancer: from molecular pathogenesis to targeted t. herapy. *Cancer Metastasis Rev.* [Epub ahead of print]
15. Wittich,S. (2002) Promotionsarbeit: Struktur-Wirkungsbeziehungen an phenylalaninhaltigen Hemmstoffen der Histon-Deacetylase, Universität Münster, Fachbereich Chemie und Pharmazie.
16. Mahlkecht,U. (2002) Charakterisierung, Funktion und pathogenetische Bedeutung von Histon-Deacetylasen. Habilitationsschrift aus dem Fachbereich Innere Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main, 1-9.
17. Becker,U., (2005) Promotionsarbeit: Einfluss von HDAC-Inhibitoren auf die tumorinduzierte Angiogenese in der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2. Justus-Liebig-Universität Gießen und Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main.
18. Marks,P.A., Rifkind,R.A., Richon,V.M., Breslow,R., Miller,T., Kelly,W.K. (2001) Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Rev.Cancer*, 194-202.
19. Kramer,O.H., Göttlicher,M., Heinzl,T. (2001) Histone deacetylase as a therapeutic target. *Trends.Endocrinol.Metab.*, 12, 294-300.
20. Johnstone,R.W. (2002) Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nat.Rev.*, 287- 299.

21. Butler,L.M., Agus,D.B., Scher,H.I., Higgins,B., Rose,A., Cordon-Cardo,C., Thaler,H.T., Rifkind,R.A., Marks,A.P., Richon,V.M. (2000) Suberoylanilide hydroxamic acid, an inhibitor of histone deacetylase, suppresses the growth of prostate cancer cells in vitro and in vivo. *Cancer Res.*, 60, 5165-5170.
22. Göttlicher,M., Minucci,S., Zhu,P., Kramer,O.H., Schimpf,A., Giavara,S., Sleeman,J.P., Lo,C.F., Nervi,C., Pelicci,P.G., Heinzl,T. (2001) Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J.*, 20, 6969-6978.
23. Krämer,O.H., Zhu,P., Ostendorff,H.P., Golebiewski,M., Tiefenbach,J., Peters,M.A., Brill,B., Groner,B., Bach,I., Heinzl,T., Gottlicher,M. (2003) The histone deacetylase inhibitor valproic acid selectively induces proteasomal degradation of HDAC2. *EMBO J.*, 22, 3411-3420.
24. Vigushin,D.M., Ali,S., Pace,P.E., Mirsaidi,N., Ito,K., Adcock,I., Coombes,R.C. (2001) Trichostatin A is a histone deacetylase inhibitor with potent antitumor activity against breast cancer in vivo. *Clin.Cancer Res.*, 7, 971-976.
25. Mark van de,K., Chen,J.S., Steliou,K., Perrine,S.P., Faller,D.V. (2003) α -lipoic acid induces p27^{KIP}-dependent cell cycle arrest in non-transformed cell lines and apoptosis in tumor cell lines. *J.Cell Physiol.*, 194, 325-340.
26. Gasteiger,J., Schunk, A. (2003) BMBF-Leitprojekt, Vernetztes Studium – Chemie.
27. <http://www.degussa-foodingredients.de>
28. Challem,J. (1996) alpha-lipoic acid: quite possibly the “universal” antioxidant. *The Nutr.Rep.*, 1-2.
29. Whiteman,M., Tritschler,H., Halliwell,B. (1996) Protection against peroxynitrite-dependent tyrosine nitration and α_1 -antiproteinase inactivation by oxidized and reduced lipoic acid. *FEBS Lett.*, 379, 74-76.
30. Packer,L., Witt,E.H., Tritschler,H.J. (1995) Alpha-lipoic acid as a biological antioxidant. *Free Radic.Biol.Med.*, 19, 227-250.
31. Lee,C.K., Lee,E.Y., Kim,Y.G., Mun,S.H., Moon,H.B., Yoo,B. (2008) Alpha-lipoic acid inhibits TNF-alpha induced NF-kappa B activation through blocking of MEKK1-MKK4-IKK signaling cascades. *Int.Immunopharmacol.*, 8(2), 362-370.

32. Dovinova,I., Novotny,L., Rauko,P., Kvasnicka,P. (1999) Combined effect of lipoic acid and doxorubicin in murine leukemia. *Neoplasma*, 46, 237-241.
33. Krishna,S., Brown,N., Faller,D.V., Spanjaard,R.A (2002) Differential effects of short-chain fatty acids on head and neck squamous carcinoma cells. *Laryngoscope*, 112, 645-650.
34. Gaschott,T., Werz,O., Steinmeyer,A., Steinhilber,D., Stein,J. (2001) Butyrate-induced differentiation of Caco-2 cells is mediated by vitamin D receptor. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 288, 690-696.
35. Gaschott,T., Steinhilber,D., Milovic,V., Stein,J. (2001) Tributyrin, a stable and rapidly absorbed prodrug of butyric acid, enhances antiproliferative effects of dihydroxycholecalciferol in human colon cancer cells. *J.Nutr.*, 131, 1839-1843.
36. Gaschott,T., Wachtershauser,A., Steinhilber,D., Stein,J. (2001) 1,25-Dihydroxycholecalciferol enhances butyrate-induced p21^{Waf1/Cip1} expression. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 283, 80-85.
37. Siavoshian,S., Segain,J.-P., Kornprobst,M., Bonnet,C., Cherbut,C., Galmiche,J.-P., Blotière,H.M. (1999) Butyrate and trichostatin A effects on the proliferation/differentiation of human intestinal epithelial cells: induction of cyclin D3 and p21 expression. *Gut*, 46, 507-514.
38. Daniel,C., Schröder,O., Zahn,N., Gaschott,T., and Stein,J. (2004) P38 MAPK signaling pathway is involved in butyrate-induced vitamin D receptor expression. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 324, 1220-1226.
39. Schwab,M., Schröder,O., Zahn,N., Stein,J. (2006) Butyrat induziert die PPAR γ -expression über p38 MAPK. *Gastroenterology*, 43.
40. Wächtershäuser,A., Stein,J. (2002) Butyratinduzierter Anstieg von PPAR γ beruht neben erhöhter Genexpression möglicherweise auch auf Hemmung des Proteasoms. *Aktuel.Ernähr.Med., Nutr.*, 10.
41. Etzrodt-Walter,G. (2005) Promotionsarbeit: Regulation von Faktoren der Angiogenese durch die kurzkettige Fettsäure Butyrat. Universität Würzburg.

42. Zgouras,D., Wächtershäuser,A., Frings,D., Stein,J. (2002) Butyrate impairs intestinal tumor cell induced angiogenesis by inhibiting HIF-1 α nuclear translocation. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 300, 832-838.
43. Arnold,I. (2001) Informationsdienst Wissenschaft. Therapie von Krebs oder Fehlbildung von Embryonen. Forschungszentrum Karlsruhe in der Helmholtz-Gemeinschaft.
44. Zgouras,D., Becker,U., Loitsch,S., Stein,J. (2004) Modulation of angiogenesis-related protein synthesis by valproic acid. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 316, 693-697.
45. Ichiyama,T., Okada,K., Lipton,J.M., Matsubara,T., Hayashi,T., Furukawa,S. (2000) Sodium valproate inhibits production of TNF- α and IL-6 and activation of NF- κ B. *BrainRes.*, 857, 246-251.
46. A.G.scientific, Inc., Trichostatin A, Streptomyces platensis, TSA.
47. Moreira,J.M.A., Scheipers,P., Sorensen,P. (2003) The histone deacetylase inhibitor Trichostatin A modulates CD4+ T cell responses. *BMC Cancer*, 3, 1471-2407.
48. Tóth,K.F., Knoch,T.A., Wachsmuth,M., Frank-Stöhr,M., Stöhr,M., Bacher,C.P., Müller,G., Rippe,K. (2004) Trichostatin A-induced histone acetylation causes decondensation of interphase chromatin. *J.Cell Sci.*, 117, 4277-4287.
49. Woo,S.H., Frechette,S., Abou,K.E., Bouchain,G., Vaisburg,A., Bernstein,N., Moradei,O., Leit,S., Allan,M., Fournel,M., Trachy-Bourget,M.C., Li,Z., Besterman,J.M., Delorme,D. (2002) Structurally simple trichostatin A-like straight chain hydroxamates as potent histone deacetylase inhibitors. *J.Med.Chem.*, 45, 2877-2885.
50. Folkman,J., Klagsbrun,M. (1987) Angiogenic factors. *Science*, 235, 442-447.
51. Beck,L., Jr., D'Amore,P.A. (1997) Vascular development: cellular and molecular regulation. *FASEB J.*, 11, 365-373.
52. Risau,W. (1998) Development and differentiation of endothelium. *Kidney Int.Suppl*, 67, S3-S6.

53. Rafii,S., Meeus,S., Dias,S., Hattori,K., Heissig,B., Shmelkov,S., Rafii,D., Lyden,D. (2002) Contribution of marrow-derived progenitors to vascular and cardiac regeneration. *Semin.Cell Dev.Biol.*, 13, 61-67.
54. Rosen,L.S. (2002) Clinical experience with angiogenesis signaling inhibitors: focus on vascular endothelial growth factor (VEGF) blockers. *Cancer Control*, 9, 36-44.
55. Folkman,J., Shing,Y. (1992) Angiogenesis. *J.Biol.Chem.*, 267, 10931-10934.
56. Gargett,C.E., Rogers,P.A. (2001) Human endometrial angiogenesis. *Reproduction.*, 121, 181-186.
57. Folkman,J. (1995) Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat.Med.*, 1, 27-31.
58. Harris,A.L. (2002) Hypoxia – a key regulatory factor in tumor growth. *Nat.Rev.Cancer*, 2, 38-47.
59. Semenza,G.L. (2003) Targeting HIF-1 for cancer therapy. *Nat.Rev.Cancer*, 3, 721-732.
60. Gunsilius,E., Tschmelitsch,J., Eberwein,M., Schwelberger,H., Spizzo,G., Kähler,C.M., Stockhammer,G., Lang,A., Petzer,A.L., Gastl,G. (2002) In vivo release of vascular endothelial growth factor from colorectal carcinomas. *Oncology*, 62, 313-317.
61. Koch,A.E. (1998) Review: angiogenesis: implications for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 41, 951-962.
62. Carmeliet,P., Jain,R.K. (2000) Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature*, 407, 249-257.
63. Matsuzaki,S., Canis,M., Darcha,C., Dechelotte,P., Pouly,J.L., and Bruhat,M.A. (1998) Angiogenesis in endometriosis. *Gynecol.Obstet.Invest*, 46, 111-115.
64. Ferrara,N. and Alitalo,K. (1999) Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nat.Med.*, 5, 1359-1364.
65. Folkman,J. (2006) Angiogenesis. *Annu.Rev.Med.*, 57, 1-18.
66. Bergers,G., Benjamin,L.E. (2003) Tumorigenesis and the angiogenic switch. *Nat.Rev.Cancer*, 3, 401-410.

67. Naumov,G.N., Bender,E., Zurakowski,D., Kang,S.Y., Flynn,E., Watnick,R.S., Straume,O., Akslen,L.A., Folkman,J., Almog,N. (2006) A model of human tumor dormancy: an angiogenic switch from the nonangiogenic phenotype. *J.Natl.Cancer Inst.*, 98, 294-295.
68. Holmgren,L., O`Reilly,M.S., Folkman,J. (1995) Dormancy of micrometastases: balanced proliferation and apoptosis in the presence of angiogenesis suppression. *Nat.Med.*, 1, 149-153.
69. Folkman,J. (2002) Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin Oncology*, 29, 15-18.
70. Carmeliet,P. (2005) VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. *Oncology*, 69, 4-10.
71. Ferrara,N. (1999) Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J.Mol.Med.*, 77, 527-543.
72. Abuharbeid,S., Czubyko,F., Aigner,A. (2005) The fibroblast growth factor-binding protein FGF-BP. *Int.J.Biochem.Cell Biol.*, 38, 1463-1468.
73. Miyashita,M., Tajiri,T., Yanagi,K., Shimizu,T., Futami,R., Sasajima,K., Tokunaga,A. (2003) Serum levels of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor and endostatin in human metastatic liver tumors. *Hepatogastroenterology*, 50, 308-309.
74. Erez,N., Milyavsky,M., Eilam,R., Shats,I., Goldfinger,N., Rotter,V. (2003) Expression of prolyl-hydroxylase-1 (PHD1/EGLN2) suppresses hypoxia inducible factor-1alpha activation and inhibits tumor growth. *Cancer Res.*, 63, 8777-8783.
75. Lee,J.W., Bae,S.H., Jeong,J.W., Kim,S.H., Kim,K.W. (2004) Hypoxia-inducible factor (HIF-1)alpha: its protein stability and biological functions. *Exp.Mol.Med.*, 36, 1-12.
76. Liu,X.H., Kirschenbaum,A., Lu,M., Yao,S., Dosoretz,A., Holland,J.F., Levine,A.C. (2002) Prostaglandin E₂ induces hypoxia-inducible factor-1 α stabilization and nuclear localization in a human prostate cancer cell line. *J.Biol.Chem.*, 51, 50081-50086.
77. Shibaji,T., Nagao,M., Ikeda,N., Kanehiro,H., Hisanaga,M., Ko,S., Fukumoto,A., Nakajima,Y. (2003) Prognostic significance of HIF-1 alpha overexpression in human pancreatic cancer. *Anticancer Res.*, 23, 4721-4727.

78. Palayoor,S.T., Tofilon,P.J., Coleman,C.N. (2003) Ibuprofen - mediated reduction of hypoxia - inducible factors HIF-1 α and HIF-2 α in prostate cancer cells. *Cancer Res.*, 9, 3150-3157.
79. Gaschott,T., Steinmeyer,A., Steinhilber,D., Stein,J. (2001) ZK 156718, a low calcemic, antiproliferative, and prodifferentiating vitamin D analogue. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 290, 504-509.
80. Gaschott,T., Stein,J. (2003) Short-chain fatty acids and colon cancer cells: the vitamin D receptor - butyrate connection. *Rec.Res.Canc.Res.*, 164, 247-257.
81. Martin-Blanco,E. (2000) p38 MAPK signalling cascades: ancient roles and new functions. *BioEssays*, 22, 637-645.
82. McMillan,L., Butcher,S.K., Pongracz,J., Lord,J.M. (2003) Opposing effects of butyrate and bile acids on apoptosis of human colon adenoma cells: differential activation of PKC and MAP kinases. *Cancer Res.*, 88, 748-753.
83. Yunis,A.A., Arimura,G.K., Russin,D.J. (1977) Human pancreatic carcinoma (MIA PaCa-2) in continuous culture: sensitivity to asparaginase. *Int.J.Cancer*, 19, 128-135.
84. Westergren-Thorsson,G., Onnervik,P.O., Fransson,L.A., Malmstrom,A. (1991) Proliferation of cultured fibroblasts is inhibited by L-iduronate-containing glycosaminoglycans. *J.Cell Physiol.*, 147, 523-530.
85. Bradford,M.M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. *Anal.Biochem.*, 72, 248-254.
86. Towbin,H., Staehelin,T., Gordon,J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 76, 4350-4354.
87. Laemmli,U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
88. Deroanne,C.F., Bonjean,K., Servotte,S., Devy,L., Colige,A., Clause,N., Blacher,S., Verdin,E., Foidart,J.-M., Nusgens,B.V., Castronovo,V. (2002) Histone deacetylases inhibitors as anti-angiogenic agents altering vascular endothelial growth factor signalling. *Oncogene*, 21, 427-436.

89. Glick,R.D., Swendeman,S.L., Coffey,D.C., Rifkind,R.A., Marks,P.A., Richon,V.M., La Quaglia,M.P. (1999) Hybrid polar histone deacetylase inhibitor induces apoptosis and CD95/CD95 ligand expression in human neuroblastoma. *Cancer Res.*, 59, 4392-4399.
90. Nervi,C., Borello,U., Fazio,F., Buffa,V., Pelicci,P.G., Cossu,G. (2001) Inhibition of histone deacetylase activity by trichostatin A modulates gene expression during mouse embryogenesis without apparent toxicity. *Cancer Res.*, 61, 1247-1249.
91. Hague,A., Manning,A.M., Hanlon,K.A., Huschtscha,L.I., Hart,D., Paraskeva,C. (1993) Sodium butyrate induces apoptosis in human colonic tumour cell lines in a p53-independent pathway: implications for the possible role of dietary fibre in the prevention of large-bowel cancer. *Int.J.Cancer*, 55, 498-505.
92. Pellizzaro,C., Coradini,D., Daidone,M.G. (2002) Modulation of angiogenesis-related proteins synthesis by sodium butyrate in colon cancer cell line HT29. *Carcinogenesis*, 23, 735-740.
93. Iyer,N.V., Kotch,L.E., Agani,F., Leung,S.W., Laughner,E., Wenger,R.H., Gassmann,M., Gearhart,J.D., Lawler,A.M., Yu,A.Y., Semenza,G.L. (1998) Cellular and developmental control of O₂ homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev.*, 12, 149-162.
94. Jiang,C.Q., Fan,L.F., Liu,Z.S., Qian,Q., Xia,D., Diao,L.M., He,Y.M., Ai,Z.L. (2004) Expression levels and significance of hypoxia inducible factor-1 alpha and vascular endothelial growth factor in human colorectal adenocarcinoma. *Chin.Med.J.(Engl.)*, 117, 1541-1546.
95. Kuwai,T., Kitadai,Y., Tanaka,S., Onogawa,S., Matsutani,N., Kaio,E., Ito,M., Chayama,K. (2003) Expression of hypoxia-inducible factor-1alpha is associated with tumor vascularization in human colorectal carcinoma. *Int.J.Cancer*, 105, 176-181.
96. Ravi,R., Mookerjee,B., Bhujwalla,Z.M., Sutter,C.H., Artemov,D., Zeng,Q., Dillehay,L.E., Madan,A., Semenza,G.L., Bedi,A. (2000) Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Genes Dev.*, 14, 34-44.

97. Semenza,G.L. (2000) HIF-1: using two hands to flip the angiogenic switch. *Cancer Metastasis Rev.*, 19, 59-65.
98. Acker,T., Plate,K.H. (2002) A role for hypoxia and hypoxia-inducible transcription factors in tumor physiology. *J.Mol.Med.*, 80, 562-575.
99. Büchler,P., Reber,H.A., Büchler,M., Shrinkante,S., Buchler,M.W., Friess,H., Semenza,G.L., Hines,O.J. (2003) Hypoxia-inducible factor 1 regulates vascular endothelial growth factor expression in human pancreatic cancer. *Pancreas*, 26, 56-64.
100. Büchler,P., Reber,H.A., Büchler,M.W., Friess,H., Lavey,R.S., Hines,O.J. (2004) Antiangiogenic activity of genistein in pancreatic carcinoma cells is mediated by the inhibition of hypoxia-inducible factor-1 and the down regulation of VEGF gene expression. *Cancer*, 100(1), 201-210.
101. Lee,Y.M., Kim,S.-H., Kim,H.-S., Son,M.J., Nakajima,H., Kwon,H.J., Kim,K.-W. (2003) Inhibition of hypoxia-induced angiogenesis by FK228, a specific histone deacetylase inhibitor, via suppression of HIF-1 α activity. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 300, 241-246.
102. Gradin,K., Toftgard,R., Poellinger,L., Berghard,A. (1999) Repression of dioxin signal transduction in fibroblasts. Identification of a putative repressor associated with Arnt. *J.Biol.Chem.*, 274, 13511-13518.
103. Pellizzaro,C., Coradini,D., Daidone,M.G. (2002) Modulation of angiogenesis-related proteins synthesis by sodium butyrate in colon cancer cell line HT29. *Carcinogenesis*, 23, 735-740.
104. Kallio,P.J., Okamoto,K., O'Brien,S., Carrero,P., Makino,Y., Tanaka,H., Poellinger,L. (1998) Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1 α . *EMBO J.*, 17, 6573-6586.
105. Richard,D.E., Berra,E., Pouyssegur,J. (1999) Angiogenesis: how a tumor adapts to hypoxia. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 266, 718-722.

106. Tanimoto,K., Makino,Y., Pereira,T., Poellinger,L. (2000) Mechanism of regulation of the hypoxia-inducible factor-1 alpha by the von Hippel-Lindau tumor suppressor protein. *EMBO J.*, 19, 4298-4309.
107. Segaert,S., Bouillon,R. (1998) Vitamin D and regulation of gene expression. *Curr. Opin.Clin.Nutr.Metab.Care*, 1, 347-354.
108. Miyaura,C., Abe,E., Kuribayashi,T., Tanaka,H., Konno,K., Nishii,Y., Suda,T. (1981) 1alpha, 25-Dihydroxyvitamin D₃ induces differentiation of human myeloid leukemia cells. *Biochem. Biophys.Res.Commun.*, 102, 937-943.
109. Brungs,M., Radmark,O., Samuelsson,B., Steinhilber,D. (1995) Sequential induction of 5-lipoxygenase gene expression and activity in Mono Mac 6 cells by transforming growth factor β and 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 92, 107-111.
110. Härle,D., Radmark,O., Samuelsson,B., Steinhilber,D. (1998) Calcitriol and transforming growth factor β upregulate 5-lipoxygenase mRNA expression by increasing gene transcription and mRNA maturation. *Eur.J.Biochem.*, 254, 275-281.
111. Mantell,D.J., Owens,P.E., Bundred,N.J., Mawer,E.B., Canfield,A.E. (2000) 1 α ,25-dihydroxyvitamin D₃ inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Circulation Res.*, 87, 214-220.
112. Tanaka,Y., Bush,K.K., Klauck,T.M., Higgins,P.J. (1989) Enhancement of butyrate-induced differentiation of HT-29 human colon carcinoma cells by 1,25-dihydroxyvitamin D₃. *Biochem.Pharmacol.*, 38, 3859-3865.
113. Yoneda,T., Aya,S., Sakuda,M. (1984) Sodium butyrate (SB) augments the effects of 1,25-dihydroxyvitamin D₃ (1,25-(OH)₂D₃) on neoplastic and osteoblastic phenotype in clonal rat osteosarcoma cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 121, 796-801.
114. Yoneda,M., Tanaka,Y., Eguchi,T., Ikekawa,N., Saijo,N. (1992) Effect of hexafluoro-1,25-dihydroxyvitamin D₃ and sodium butyrate combination on differentiation and proliferation of HL-60 leukemia cells. *Anticancer Res.*, 12, 1947-1952.
115. Wächtershäuser,A., Stein,J. (2001) Butyrate-induced differentiation of Caco-2 cells occurs independently from p27. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 281, 295-299.

116. Archer,S.Y., Meng,S., Shei,A., Hodin,R.A. (1998) p21^{WAF1} is required for butyrate-mediated growth inhibition of human colon cancer cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.USA*, 95, 6791-6796.
117. Litvak,D.A., Evers,B.M., Hwang,K.O., Hellmich,M.R., Ko,T.C., Townsend,C.M.,Jr. (1998) Butyrate induced differentiation of Caco-2 cells is associated with apoptosis and early induction of p21^{Waf1/Cip1} and p27^{Kip1}. *Surgery*, 124, 161-169.
118. Wang,J., Friedman,E.A. (1998) Short-chain fatty acids induce cell cycle inhibitors in colonocytes. *Gastroenterology*, 114, 940-946.
119. Kisker,O., Onizuka,S., Becker,C.M., Fannon,M., Flynn,E., D`Amato,R., Zetter,B., Folkman,J., Ray,R., Swamy,N., Pirie-Shepherd,S. (2003) Vitamin D binding protein-macrophage activating factor (DBP-maf) inhibits angiogenesis and tumor growth in mice. *Neoplasia*, 5, 32-40.
120. Finlay,I.G., Stewart,G.J., Shirley,P., Woolfe,S., Pourgholami,M.H., Morris,D.L. (2001) Hepatic arterial and intravenous administration of 1,25-dihydroxy-vitamin D₃-evidence of a clinically significant hepatic first-pass effect. *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 48, 209-214.
121. Witt,O., Sand,K., Pekrun,A. (2000) Butyrate-induced erythroid differentiation of human K562 leukemia cells involves inhibition of ERK and activation of p38 MAP kinase pathways. *Neoplasia*, 95 (7), 2391-2396.
122. Cano,E., Mahadevan,L.C. (1995) Parallel signal processing among mammalian MAPKs. *TIBS*, 20, 117.
123. Lewis,T.S., Shapiro,P.S., Ahn,N.G. (1998) Signal transduction through MAP kinase cascades. *Adv.Cancer Res.*, 74, 49.
124. Seger,R., Krebs,E.G. (1995) The MAPK signalling cascade. *FASEB J.*, 9, 726.
125. Ißbrücker,K. (2002) Promotionarbeit: Mechanismen der Signaltransduktion in Angiogenese und Tissue-factor Produktion durch den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF). Philipps-Universität Marburg.
126. MAP Kinase Pathways Research Tools, Calbiochem.

127. Ogborne,R.M., Rushworth,S.A., O'Connell,M.A. (2005) α -lipoic acid-induced heme oxygenase-1 expression is mediated by nuclear factor erythroid 2-related factor 2 and p38 mitogen-activated protein kinase in human monocytic cells. *Arterioscler.Thromb.Vasc.Biol.*, 25, 2100-2105.
128. Ding,X.-Z., Tong,W.-G., Adrian,T.E. (2003) Multiple signal pathways are involved in the mitogenic effect of 5(S)-HETE in human pancreatic cancer. *Oncology*, 65, 285-294.
129. Davie,J.R., Samuel,S.K., Spencer,V.A., Holth,L.T., Chadee,D.N., Peltier,C.P., Sun,J.M., Chen,H.Y., Wright,J.A. (1999) Organization of chromatin in cancer cells: role of signalling pathways. *Biochem.Cell Biol.*, 77, 265-275.
130. Krasilnikov,M.A. (2000) Phosphatidylinositol-3 kinase dependent pathways: the role in control of cell growth, survival, and malignant transformation. *Biochem.*, 65, 59-67.
131. Weinstein,I.B., Kahn,S.M., O'Driscoll,K., Borner,C., Bang,D., Jiang,W., Blackwood,A., Nomoto,K. (1997) The role of protein kinase C in signal transduction, growth control and lipid metabolism. *Adv.Exp.Med.Biol.*, 400A, 313-321.
132. Klohs,W.D., Fry,D.W., Kraker,A.J. (1997) Inhibitors of tyrosine kinase. *Curr.Opin.Oncol.*, 9, 526-528.
133. Nishio,M., Habuchi,Y., Tanaka,H., Morikawa,J., Okanoue,T., Kashima,K. (1999) Tyrosine kinase-dependent modulation by interferon-alpha of the ATP-sensitive K⁺ current in rabbit ventricular myocytes. *FEBS Lett.*, 445, 87-91.
134. Hata,K., Nishimura,R., Ikeda,F., Yamashita,K., Matsubara,T., Nokubi,T., Yoneda,T. (2002) Differential roles of Smad1 and p38 kinase in regulation of peroxisome proliferator-activating receptor γ during bone morphogenetic protein 2-induced adipogenesis. *Mol.Biol.Cell*, 14, 545-555.

EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG

Ich erkläre ehrenwörtlich, dass ich die vorgelegte Dissertation mit dem Titel:

**„Der Einfluss von α -Liponsäure und weiteren HDAC-Inhibitoren
auf Tumorwachstum und Angiogenese
in der Pankreaskarzinomzelllinie MIA-PaCa-2“**

in der Medizinischen Klinik II, Schwerpunkt Gastroenterologie und Pneumologie/Allergologie unter Leitung von Herrn Prof. Dr. Dr. Jürgen Stein selbstständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe durchgeführt und bei der Abfassung dieser Arbeit keine anderen als die hier aufgeführten Hilfsmittel verwendet habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.

Ich habe bisher weder an einer in- oder ausländischen Medizinischen Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Frankfurt am Main, 2008