

# **Einfluss von HDAC-Inhibitoren auf die tumorinduzierte Angiogenese in der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2**

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

Ute Becker

Aus dem Institut für Veterinär-Physiologie  
der Justus-Liebig-Universität Gießen  
Betreuer: Prof. Dr. M. Diener

**und**

dem Zentrum der Inneren Medizin  
des Fachbereichs Medizin  
der Johann Wolfgang Goethe-Universität  
Frankfurt am Main  
Betreuer: Prof. Dr. Dr. J. Stein

# **Einfluss von HDAC-Inhibitoren auf die tumorinduzierte Angiogenese in der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2**

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

Eingereicht von  
Ute Becker  
Tierärztin aus Aschaffenburg

Gießen, 2006

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

Dekan:

Prof. Dr. M. Reinacher

Gutachter:

Prof. Dr. M. Diener

Prof. Dr. Dr. J. Stein

Tag der Disputation:

24.02.2006

In Liebe und Dankbarkeit  
Meinen Eltern

## **Danksagung**

An dieser Stelle möchte ich mich bei allen bedanken, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Mein ganz besonderer Dank gilt meinem Doktorvater Herrn Professor Dr. Dr. Jürgen Stein für die Überlassung des Themas. Durch die Erstellung meiner Doktorarbeit in seiner Arbeitsgruppe wurde mir ermöglicht, meine Freude am wissenschaftlichen Arbeiten zu entdecken. Auch möchte ich mich für sein stetes Interesse am Fortgang meines Promotionsvorhabens und für die hilfreichen Anregungen bei der Korrektur der Arbeit herzlich bedanken.

Ganz besonders danke ich meinem Doktorvater Herrn Prof. Dr. Martin Diener für sein Interesse an meiner Arbeit und seine Bereitschaft, meine Dissertation vor dem Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen zu vertreten.

Stefan Loitsch möchte ich besonders für seine Ratschläge und stete Unterstützung bei der Durchführung der molekularbiologischen Experimente danken.

Ferner bedanke ich mich bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe Stein und allen Mitarbeitern des gastroenterologischen Labors für ihre Freundlichkeit und kollegiale Zusammenarbeit. Ganz besonders möchte ich Carolin, Sandra, Tanja, Nadine und Birgit für die herzliche Arbeitsatmosphäre und ihre immerwährende Hilfsbereitschaft danken.

Meinen Eltern Marianne und Alexander sowie meinem Lebensgefährten Jürgen danke ich für ihre uneingeschränkte Unterstützung während der Erstellung dieser Arbeit.

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

Aschaffenburg, im August 2005

**Verzeichnis der Abkürzungen**

|              |   |
|--------------|---|
| aFGF         | Acidic fibroblast growth factor   |
| ATP          | Adenosintriphosphat   |
| AKT          | Serin/Threonin Kinase, Proteinkinase B                                    |
| AMC          | 7-Amino-4-methylcoumarin  |
| AP           | Alkalische Phosphatase  |
| APS          | Ammoniumperoxidsulfat   |
| Aqua ad inj. | Aqua ad injectabilia  |
| Aqua bidest. | Aqua bidestillata   |
| ATP          | Adenosintriphosphat   |
| BM           | Basalmembran  |
| bp           | Basenpaare  |
| BrdU         | 5-Bromo-2'-deoxy-Uridine  |
| Caco-2       | Kolonadenokarzinomzellen  |
| COX          | Cyclooxygenase  |
| cDNA         | <i>Copy</i> -DNA  |
| DMEM         | Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium  |
| DMSO         | Dimethylsulfoxid  |
| DNA          | Desoxyribonukleinsäure  |
| dNTPs        | Desoxribonukleotid-Triphosphate (dATP, dCTP, dGTP, dTTP)                  |
| DTT          | 1,4-Dithio-L-Threitol   |
| ECM          | Extrazelluläre Matrix   |
| EDTA         | Ethylendiamin-bis-( $\beta$ -aminoethoxyethan)-N,N,N',N',-tetraessigsäure |
| EGF          | Epidermal growth factor   |
| ELISA        | Enzyme-linked Immunosorbent Assay   |
| eNOS         | Endotheliale NO-Synthase  |
| Etbr.        | Ethidiumbromid  |
| FCS          | Foetales Kälberserum  |
| FGF-2, bFGF  | Basic fibroblast growth factor  |
| FGF-BP       | FGF-binding Protein   |
| FGFR         | FGF-Rezeptor  |
| FKBP         | FK506 binding protein   |
| FRAP         | FKBP-rapamycin associated protein, mTOR                                   |
| GAP          | Glyceraldehyd-3-phosphat  |

|                 |   |
|-----------------|---|
| GAPDH           | Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase                    |
| HAT             | Histonacetyltransferase                                   |
| HDAC            | Histondeacetylase   |
| HEPES           | 2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-piperazin)-ethansulfonsäure       |
| HIF-1 $\alpha$  | Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$                       |
| HRE             | Hypoxia response element                                  |
| HRP             | Horse radish peroxidase, Meerrettichperoxidase            |
| HSPG            | Heparansulfatproteoglykan                                 |
| HUVEC           | Human umbilical vein endothelial cell                     |
| IGF             | Insulin-like growth factor                                |
| IST             | Interner Standard   |
| MAPK            | Mitogen-aktivierte Proteinkinase                          |
| MMP             | Matrixmetalloproteinase                                   |
| mRNA            | Messenger-Ribonukleinsäure                                |
| NO              | Stickstoffmonoxid   |
| p               | Signifikanz   |
| pAKT            | Phosphorylierte Form der Proteinkinase B                  |
| pO <sub>2</sub> | Sauerstoffpartialdruck                                    |
| PBS             | Phosphat-gepufferte isotonische NaCl-Lösung               |
| PCR             | Polymerase chain reaction, Polymerasekettenreaktion       |
| PDGF            | Platelet-derived growth factor                            |
| PI3K            | PI3-Kinase, Phosphatidylinositol 3-Kinase                 |
| PIGF            | Placenta growth factor                                    |
| PPAR $\gamma$   | Peroxisome proliferator activated receptor $\gamma$       |
| PTEN            | Phosphatase und Tensin Homologe deletiert an Chromosom 10 |
| pVHL            | Von Hippel-Lindau Tumorsuppressorprotein                  |
| RNA             | Ribonukleinsäure  |
| RT              | Reverse Transkription                                     |
| SDS             | Dodecylsulfat, Natriumsalz                                |
| <i>Taq</i>      | <i>Thermus aquaticus</i>                                  |
| 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                                |

|       |  |
|-------|--|
| TIMP  | Tissue inhibitor of metalloproteinases |
| TNF   | Tumornekrosefaktor                     |
| Tris  | Tris-(hydroxymethyl)-methylamin        |
| TSA   | Trichostatin A                         |
| VDR   | Vitamin D Rezeptor                     |
| VEGF  | Vascular endothelial growth factor     |
| VEGFR | VEGF-Rezeptor                          |
| vHL   | Von Hippel-Lindau Tumorsuppressorgen   |
| VPA   | Valproat                               |
| v/v   | Volumen/Volumen                        |
| w/v   | Masse/Volumen                          |

## Verzeichnis der Abbildungen

|                |   |    |
|----------------|---|----|
| Abbildung 1.1  | Modell der Kolonkarzinogenese   | 3  |
| Abbildung 1.2  | <i>Angiogenic switch</i> vom nichtangiogenen Tumor<br>zum angiogenen Phänotyp   | 8  |
| Abbildung 1.3  | Der Angiogeneseprozess  | 9  |
| Abbildung 1.4  | Die Wachstumsfaktor-induzierte Tumorangiogenese   | 11 |
| Abbildung 1.5  | Modell der Interaktion zwischen FGF-2, seinem Rezeptor und<br>dem als Co-Rezeptor fungierenden Heparansulfatproteoglykan                                      | 12 |
| Abbildung 1.6  | Autokrine und parakrine Wirkung von FGF-2   | 13 |
| Abbildung 1.7  | Die VEGF-Familie und ihre Rezeptoren  | 16 |
| Abbildung 1.8  | Die Regulation der HIF-1 $\alpha$ Aktivität unter<br>physiologischen und pathologischen Bedingungen   | 19 |
| Abbildung 1.9  | Die Nukleosomenstruktur   | 25 |
| Abbildung 1.10 | Reversible Histonacetylierung   | 26 |
| Abbildung 1.11 | Strukturformeln von Valproat, Butyrat und Trichostatin A  | 31 |
| Abbildung 2.1  | Caco-2 Kolonadenokarzinomzellen in Kultur   | 43 |
| Abbildung 2.2  | <i>Human umbilical vein endothelial cells</i> (HUVECs) in Kultur  | 43 |
| Abbildung 2.3  | Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR)  | 53 |
| Abbildung 2.4  | Beispiel einer RT-kompetitiven Multiplex-PCR  | 54 |
| Abbildung 2.5  | Konstruktion eines internen Standards für die kompetitive PCR   | 57 |
| Abbildung 2.6  | Migration von HUVECs durch eine Polycarbonat-Membran<br>mit Mikroporen  | 63 |
| Abbildung 3.1  | Zellzahl von HUVECs nach 48-stündiger Inkubation mit<br>Zellkulturüberständen unbehandelter Caco-2 Zellen   | 66 |
| Abbildung 3.2  | Zellproliferation von HUVECs nach 24- bzw. 48-stündiger<br>Inkubation mit Valproat [1 mM, 3 mM], Butyrat<br>[1 mM, 3 mM] oder Trichostatin A [100 nM, 400 nM] | 68 |
| Abbildung 3.3  | HUVECs nach 48-stündiger Inkubation mit Valproat [3 mM],<br>Butyrat [3 mM] oder Trichostatin A [400 nM]   | 69 |
| Abbildung 3.4  | Zellproliferation von HUVECs nach 24-stündiger Inkubation<br>mit konditionierten Caco-2 Medien  | 70 |
| Abbildung 3.5  | Migration von HUVECs durch eine Polycarbonat-Membran<br>nach 5 Stunden Inkubationszeit  | 72 |

|                 |   |    |
|-----------------|---|----|
| Abbildung 3.6   | Migration von HUVECs durch eine Polycarbonat-Membran nach 5 Stunden Inkubationszeit   | 73 |
| Abbildung 3.7   | Migration von HUVECs durch eine Polycarbonat-Membran nach 5 Stunden Inkubationszeit   | 74 |
| Abbildung 3.8   | <i>In vitro</i> Angiogenese von HUVECs nach Inkubation mit Valproat [3 mM], Butyrat [3 mM] oder Trichostatin A [400 nM] über Nacht  | 76 |
| Abbildung 3.9   | <i>In vitro</i> Angiogenese von HUVECs nach über-Nacht-Inkubation mit Zellkulturüberständen von Caco-2 Zellen, die zuvor 48 Stunden mit Valproat [3 mM], Butyrat [3 mM] oder Trichostatin A [400 nM] behandelt wurden   | 76 |
| Abbildung 3.10  | VEGF Konzentration im Zellkulturüberstand von Caco-2 Zellen nach 12-, 24- und 48-stündiger Inkubation mit Valproat [1 mM, 3 mM], Butyrat [1 mM, 3 mM] oder Trichostatin A [100 nM, 400 nM]  | 78 |
| Abbildung 3.11a | Western Blot des VEGF Proteins im Gesamthomogenat der Caco-2 Zellen nach 72-stündiger Inkubation mit Valproat [1 mM, 3 mM], Butyrat [1 mM, 3 mM] oder Trichostatin A [100 nM, 400 nM]   | 79 |
| Abbildung 3.11b | Quantifizierung des VEGF Proteins im Gesamthomogenat der Caco-2 Zellen nach 72-stündiger Inkubation mit Valproat [1 mM, 3 mM], Butyrat [1 mM, 3 mM] oder Trichostatin A [100 nM, 400 nM]  | 79 |
| Abbildung 3.12  | <b>A:</b> RT-kompetitive Multiplex-PCR von VEGF zusammen mit GAPDH in Caco-2 Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Valproat [3 mM] oder Butyrat [3 mM]<br><b>B:</b> Relative Abnahme der VEGF mRNA in Caco-2 Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Valproat [3 mM] oder Butyrat [3 mM] im Verhältnis zu GAPDH | 82 |
| Abbildung 3.13  | <b>A:</b> RT-kompetitive Multiplex-PCR von VEGF zusammen mit GAPDH in Caco-2 Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Trichostatin A [100 nM, 200 nM, 400 nM, 800 nM]<br><b>B:</b> Relative Abnahme der VEGF mRNA in Caco-2 Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Trichostatin A [100 nM, 200 nM,                |    |

---

|                 |   |    |
|-----------------|---|----|
|                 | 400 nM, 800 nM] im Verhältnis zu GAPDH  | 83 |
| Abbildung 3.14a | Western Blot des FGF-2 Proteins im Gesamthomogenat der Caco-2 Zellen nach 6-stündiger Inkubation mit Valproat [1 mM, 3 mM], Butyrat [1 mM, 3 mM] oder Trichostatin A [100 nM, 400 nM]     | 85 |
| Abbildung 3.14b | Quantifizierung des FGF-2 Proteins im Gesamthomogenat der Caco-2 Zellen nach 6-stündiger Inkubation mit Valproat [1 mM, 3 mM], Butyrat [1 mM, 3 mM] oder Trichostatin A [100 nM, 400 nM]  | 85 |
| Abbildung 3.15a | Western Blot des FGF-2 Proteins im Gesamthomogenat der Caco-2 Zellen nach 12-stündiger Inkubation mit Valproat [1 mM, 3 mM], Butyrat [1 mM, 3 mM] oder Trichostatin A [100 nM, 400 nM]    | 86 |
| Abbildung 3.15b | Quantifizierung des FGF-2 Proteins im Gesamthomogenat der Caco-2 Zellen nach 12-stündiger Inkubation mit Valproat [1 mM, 3 mM], Butyrat [1 mM, 3 mM] oder Trichostatin A [100 nM, 400 nM] | 86 |
| Abbildung 3.16a | Western Blot des FGF-2 Proteins im Gesamthomogenat der Caco-2 Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Valproat [1 mM, 3 mM], Butyrat [1 mM, 3 mM] oder Trichostatin A [100 nM, 400 nM]    | 87 |
| Abbildung 3.16b | Quantifizierung des FGF-2 Proteins im Gesamthomogenat der Caco-2 Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Valproat [1 mM, 3 mM], Butyrat [1 mM, 3 mM] oder Trichostatin A [100 nM, 400 nM] | 87 |
| Abbildung 3.17a | Western Blot des FGF-2 Proteins im Gesamthomogenat der Caco-2 Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit Valproat [1 mM, 3 mM], Butyrat [1 mM, 3 mM] oder Trichostatin A [100 nM, 400 nM]    | 88 |
| Abbildung 3.17b | Quantifizierung des FGF-2 Proteins im Gesamthomogenat der Caco-2 Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit Valproat [1 mM, 3 mM], Butyrat [1 mM, 3 mM] oder Trichostatin A [100 nM, 400 nM] | 88 |

|                 |   |    |
|-----------------|---|----|
| Abbildung 3.18a | Western Blot des HIF-1 $\alpha$ Proteins im Gesamthomogenat der Caco-2 Zellen nach 6-stündiger Inkubation mit Valproat [1 mM, 3 mM], Butyrat [1 mM, 3 mM] oder Trichostatin A [100 nM, 400 nM]          | 91 |
| Abbildung 3.18b | Quantifizierung des HIF-1 $\alpha$ Proteins im Gesamthomogenat der Caco-2 Zellen nach 6-stündiger Inkubation mit Valproat [1 mM, 3 mM], Butyrat [1 mM, 3 mM] oder Trichostatin A [100 nM, 400 nM]       | 92 |
| Abbildung 3.18c | Quantifizierung des HIF-1 $\alpha$ Proteins im Gesamthomogenat der Caco-2 Zellen nach 12-stündiger Inkubation mit Valproat [1 mM, 3 mM], Butyrat [1 mM, 3 mM] oder Trichostatin A [100 nM, 400 nM]      | 92 |
| Abbildung 3.18d | Quantifizierung des HIF-1 $\alpha$ Proteins im Gesamthomogenat der Caco-2 Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Valproat [1 mM, 3 mM], Butyrat [1 mM, 3 mM] oder Trichostatin A [100 nM, 400 nM]      | 93 |
| Abbildung 3.18e | Quantifizierung des HIF-1 $\alpha$ Proteins im Gesamthomogenat der Caco-2 Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit Valproat [1 mM, 3 mM], Butyrat [1 mM, 3 mM] oder Trichostatin A [100 nM, 400 nM]      | 93 |
| Abbildung 3.19  | Aktivität des HIF-1 $\alpha$ Proteins in der nukleären Fraktion von Caco-2 Zellen nach 1-, 12-, 24- und 48-stündiger Inkubation mit Valproat [3 mM], Butyrat [3 mM] oder Trichostatin A [400 nM]        | 95 |
| Abbildung 3.20  | Proteasomale Aktivität im Zelllysate von Caco-2 Zellen nach 24- bzw. 48-stündiger Inkubation mit Valproat [3 mM], Butyrat [3 mM] oder Trichostatin A [400 nM]   | 96 |
| Abbildung 3.21a | Western Blots des Akt-2 und des p-Akt Proteins im Gesamthomogenat der Caco-2 Zellen nach 60-minütiger Inkubation mit Valproat [1 mM, 3 mM], Butyrat [1 mM, 3 mM] oder Trichostatin A [100 nM, 400 nM]   | 98 |
| Abbildung 3.21b | Quantifizierung des Akt-2 und des p-Akt Proteins im Gesamthomogenat der Caco-2 Zellen nach 60-stündiger Inkubation mit Valproat [1 mM, 3 mM], Butyrat [1 mM, 3 mM] oder Trichostatin A [100 nM, 400 nM] | 98 |

|                |   |     |
|----------------|---|-----|
| Abbildung 3.22 | Western Blot des PI3-Kinase Proteins in Caco-2 Zellen nach 10- und 30-minütiger Inkubation mit Valproat [1 mM, 3 mM], Butyrat [1 mM, 3 mM] oder Trichostatin A [100 nM, 400 nM] | 99  |
| Abbildung 4.1  | Die Regulation der HIF-1 $\alpha$ Aktivität und die mögliche Beeinflussung durch HDAC-Inhibitoren in Caco-2 Zellen  | 117 |

## Verzeichnis der Tabellen

|             |  |    |
|-------------|--|----|
| Tabelle 1.1 | Pro- und antiangiogen wirkende Faktoren                          | 7  |
| Tabelle 1.2 | Von Histondeacetylasen regulierte, pathogenetisch relevante Gene | 27 |
| Tabelle 1.3 | Verschiedene Gruppen von Histondeacetylase-Inhibitoren           | 29 |

# INHALTSVERZEICHNIS

|   |           |
|---|-----------|
| <b>DANKSAGUNG</b>   | <b>I</b>  |
| <b>VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN</b>                                  | <b>II</b> |
| <b>VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN</b>                                  | <b>V</b>  |
| <b>VERZEICHNIS DER TABELLEN</b>                                     | <b>X</b>  |
| <b>INHALTSVERZEICHNIS</b>   | <b>XI</b> |
| <br>  |           |
| <b>1. EINLEITUNG</b>  | <b>1</b>  |
| <b>1.1 Das kolorektale Karzinom</b>                                 | <b>1</b>  |
| 1.1.1 Epidemiologie   | 1         |
| 1.1.2 Ätiologie   | 1         |
| 1.1.3 Kolonkarzinogenese  | 2         |
| 1.1.4 Prävention  | 3         |
| 1.1.5 Therapie  | 4         |
| <b>1.2 Physiologie und Pathophysiologie der Angiogenese</b>         | <b>5</b>  |
| 1.2.1 Die tumorinduzierte Angiogenese                               | 6         |
| 1.2.1.1 <i>Angiogenic switch</i>                                    | 6         |
| 1.2.1.2 Der Angiogeneseprozess                                      | 8         |
| 1.2.2 Die Wachstumsfaktoren FGF-2 und VEGF                          | 10        |
| 1.2.2.1 Der Wachstumsfaktor FGF-2                                   | 10        |
| 1.2.2.2 Der Wachstumsfaktor VEGF                                    | 14        |
| 1.2.3 Der Transkriptionsfaktor HIF-1 $\alpha$                       | 18        |
| 1.2.4 Strategien zu Hemmung der tumorinduzierten Angiogenese        | 21        |
| <b>1.3 Histondeacetylasen</b>                                       | <b>24</b> |
| 1.3.1 Einführung  | 24        |
| 1.3.2 Pathogenetische Bedeutung von HDACs bei malignen Erkrankungen | 26        |
| 1.3.3 Bedeutung von HDACs für die Tumorangiogenese                  | 26        |
| 1.3.4 Hemmung von Histondeacetylasen                                | 28        |
| 1.3.4.1 Der Histondeacetylase-Inhibitor Valproat                    | 30        |
| 1.3.4.2 Der Histondeacetylase-Inhibitor Butyrat                     | 32        |
| 1.3.4.3 Der Histondeacetylase-Inhibitor Trichostatin A              | 34        |
| <b>1.4 Ziel der Arbeit</b>  | <b>35</b> |

---

|   |           |
|---|-----------|
| <b>2 MATERIAL UND METHODEN</b>  | <b>36</b> |
| <b>2.1 Chemikalien und Lösungen</b>   | <b>36</b> |
| 2.1.1 Allgemeine Chemikalien und Lösungen   | 36        |
| 2.1.2 Primer  | 38        |
| 2.1.3 Antikörper  | 39        |
| 2.1.3.1 Erstantikörper  | 39        |
| 2.1.3.2 Zweitantikörper   | 39        |
| 2.1.4 Kit-Systeme   | 39        |
| <b>2.2 Arbeitsmaterialien und Geräte</b>  | <b>40</b> |
| 2.2.1 Arbeitsmaterialien  | 40        |
| 2.2.2 Geräte  | 40        |
| <b>2.3 Zelllinien</b>   | <b>42</b> |
| 2.3.1 Die Zelllinie Caco-2  | 42        |
| 2.3.2 Die Zelllinie HUVEC   | 42        |
| <b>2.4 Zellkulturtechnik</b>  | <b>44</b> |
| 2.4.1 Kultivierung der Zellen   | 44        |
| 2.4.2 Passagieren der Zellen  | 45        |
| <b>2.5 Gewinnung zellulärer Proteine</b>  | <b>46</b> |
| <b>2.6 Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford</b>   | <b>46</b> |
| <b>2.7 Immunologischer Nachweis von Proteinen (Western Blot)</b>  | <b>47</b> |
| 2.7.1 SDS-PAGE  | 47        |
| 2.7.2 Proteintransfer auf Nitrozellulose  | 48        |
| 2.7.3 Immunchemische Detektion mittels Chemilumineszenz   | 49        |
| <b>2.8 Gewinnung von Caco-2 Zellkulturüberständen</b>   | <b>50</b> |
| <b>2.9 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) zur Quantifizierung von VEGF</b>                             | <b>51</b> |
| <b>2.10 RT-kompetitive Multiplex-PCR</b>  | <b>51</b> |
| 2.10.1 RNA-Isolierung   | 55        |
| 2.10.2 Reverse Transkription der RNA in cDNA  | 55        |
| 2.10.3 Konstruktion des internen Standards (Kompetitor)   | 56        |
| 2.10.4 Kompetitive Multiplex-PCR  | 57        |
| 2.10.5 Agarosegelelektrophorese   | 58        |
| <b>2.11 Detektion und Quantifizierung der HIF-1<math>\alpha</math> Aktivierung in nukleären Zellextrakten</b> | <b>60</b> |
| <b>2.12 Bestimmung der proteasomalen Aktivität im Zellysat</b>  | <b>60</b> |

---

|  |            |
|--|------------|
| <b>2.13 Versuche mit der Endothelzelllinie HUVEC</b>   | <b>61</b>  |
| 2.13.1 Bestimmung der Zellproliferation mittels BrdU-Test  | 61         |
| 2.13.2 Bestimmung der Zellzahl mit Kristallviolett   | 62         |
| 2.13.3 Migration   | 62         |
| 2.13.4 <i>In vitro</i> Angiogenese, <i>tube formation</i>  | 64         |
| <b>2.14 Statistische Auswertung</b>  | <b>64</b>  |
| <b>3 ERGEBNISSE</b>  | <b>65</b>  |
| <b>3.1 Zellzahl von HUVECs</b>   | <b>65</b>  |
| <b>3.2 Einfluss von Valproat, Butyrat und Trichostatin A auf die Proliferation, Migration und <i>in vitro</i> Angiogenese von HUVECs</b> | <b>67</b>  |
| 3.2.1 Zellproliferation von HUVECs   | 67         |
| 3.2.2 Migration von HUVECs   | 71         |
| 3.2.3 <i>In vitro</i> Angiogenese von HUVECs   | 74         |
| <b>3.3 Einfluss von Valproat, Butyrat und Trichostatin A auf die Synthese von VEGF und FGF-2 in Caco-2 Zellen</b>                        | <b>77</b>  |
| 3.3.1 Sekretion von VEGF   | 77         |
| 3.3.2 Proteinexpression von VEGF   | 78         |
| 3.3.3 VEGF Genexpression   | 80         |
| 3.3.4 Proteinexpression von FGF-2  | 84         |
| <b>3.4 Einfluss von Valproat, Butyrat und Trichostatin A auf Angiogenese-relevante Faktoren</b>  | <b>89</b>  |
| 3.4.1 Proteinexpression von HIF-1 $\alpha$   | 89         |
| 3.4.2 HIF-1 $\alpha$ Aktivität   | 94         |
| 3.4.3 Proteasomale Aktivität in Caco-2 Zellen  | 95         |
| 3.4.4 Der PI3-Kinase/AKT Signaltransduktionsweg  | 97         |
| <b>4 DISKUSSION</b>  | <b>101</b> |
| <b>4.1 HDAC-Inhibitoren und Angiogenese</b>  | <b>101</b> |
| <b>4.2 Caco-2 Zellkulturüberständen und Endothelzellfunktionen</b>   | <b>104</b> |
| 4.2.1 FGF-2  | 106        |
| 4.2.2 VEGF   | 107        |
| 4.2.3 Wirkung von Valproat, Butyrat und Trichostatin A auf FGF-2 und VEGF  | 110        |

|   |            |
|---|------------|
| <b>4.3 Bedeutung von HIF-1<math>\alpha</math></b>         | <b>112</b> |
| 4.3.1 Hemmung von HIF-1 $\alpha$                          | 113        |
| 4.3.2 Proteosomaler Abbauweg                              | 115        |
| <b>4.4. Die PI3-Kinase/AKT Signaltransduktionskaskade</b> | <b>118</b> |
| <br>  |            |
| <b>5 ZUSAMMENFASSUNG</b>                                  | <b>121</b> |
| <b>6 SUMMARY</b>  | <b>123</b> |
| <b>7 LITERATURVERZEICHNIS</b>                             | <b>124</b> |

**EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG**

# 1 EINLEITUNG

## 1.1 Das kolorektale Karzinom

### 1.1.1 Epidemiologie

Das kolorektale Karzinom zählt zu den häufigsten Tumorarten weltweit. In der globalen Krebserkrankungsstatistik steht es mit 9,4% bei Männern und 10,1% bei Frauen an vierter Stelle [1]. Dabei sind vor allem in der industrialisierten Welt (Nordamerika, Nord-, Süd-, Westeuropa, Neuseeland) viele Menschen von dieser Krebsart betroffen [1;2]. In Deutschland stellt der Darmkrebs nach Brust- bzw. Prostatakrebs mittlerweile für beide Geschlechter die zweithäufigste Krebserkrankung dar. Laut Angaben der Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland sind Frauen mit 34.000 Neuerkrankungen pro Jahr und Männer mit 32.000 Neuerkrankungen pro Jahr betroffen. Diese aktuellen – im Vergleich zu früheren Angaben bis zu 10% höheren – Werte wurden in Zusammenarbeit mit dem Robert Koch-Institut ermittelt. Sie ergeben sich aus der Einbeziehung auch der bereits zuvor an einer anderen Krebsart erkrankten Personen [3]. Im Vergleich mit anderen EU-Ländern weist Deutschland die höchste Inzidenz auf. Männer erkranken im Mittel mit etwa 67 Jahren, Frauen mit etwa 72 Jahren. Für beide Geschlechter ist Darmkrebs die zweithäufigste durch Krebs bedingte Todesursache in Deutschland. Das Lebenszeitrisiko, an einem Karzinom des Kolons oder des Rektums zu erkranken, liegt bei etwa 4-6% [3;4] .

### 1.1.2 Ätiologie

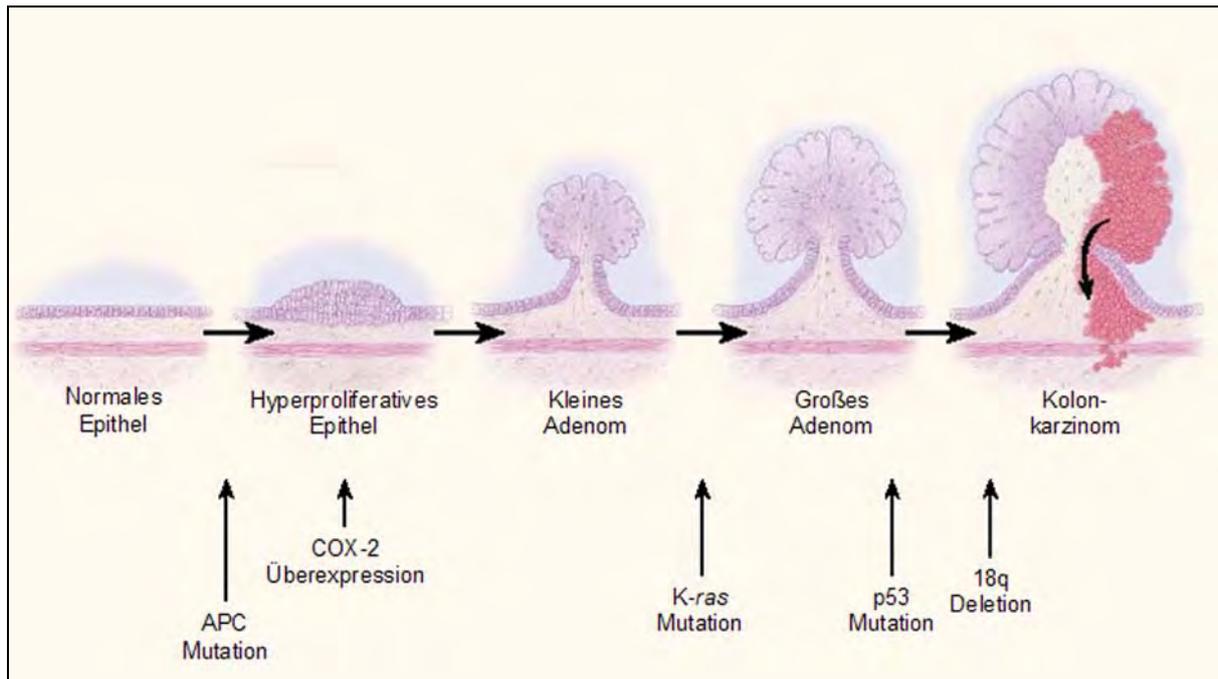
Über 75-85% der kolorektalen Karzinome entwickeln sich aus sporadisch auftretenden adenomatösen Polypen [5;6]. Die Inzidenz von Adenomen bei der westlichen Bevölkerung wurde in *post mortem* Studien ermittelt und beträgt ca. 30-40%. Die häufig multiplen Polypen liegen i.d.R. asymptomatisch vor. Etwa 10% aller Polypen sind flache Adenome, die endoskopisch schwer zu erkennen sind und vermutlich eine vergleichsweise höhere Transformationsrate zum malignen Phänotyp aufweisen [5].

Schätzungen zufolge sind 5-15% der kolorektalen Karzinome erblich bedingt. Zu den endogenen Faktoren, die das Erkrankungsrisiko steigern, zählen das hereditäre, nicht-

polypöse kolorektale Krebsyndrom (HNPCC) und erblich bedingte Adenomatosen (FAP). Als weniger bedeutende Quellen gelten z.B. das juvenile Polyposis Syndrom sowie das Peutz-Jeghers Syndrom. Die Wahrscheinlichkeit ein Kolonkarzinom zu entwickeln erhöht sich bei Verwandten ersten Grades von Darmkrebspatienten um das Zwei- bis Dreifache. Auch chronisch-entzündliche Darmerkrankungen wie Colitis ulcerosa und Morbus Crohn vergrößern das Krebsrisiko. Hierbei beeinflussen insbesondere die Erkrankungsdauer und die Ausdehnung der Inflammation das individuelle Erkrankungsrisiko. Als exogene Risikofaktoren gelten Ernährungsgewohnheiten (u.a. ballaststoffarme Kost, tierische Fette, hohe Gesamtkalorienaufnahme) sowie Bewegungsmangel [7]. Die Beteiligung von Umweltfaktoren wird allerdings umstritten diskutiert und ist Gegenstand zahlreicher aktueller Studien [1;3;4;8;9].

### **1.1.3 Kolonkarzinogenese**

Durch molekulare Analysen kolorektaler Adenome und Karzinome konnte ein genetisches Modell der Kolonkarzinogenese entwickelt werden [10;11]. **Abbildung 1.1** zeigt, dass es sich bei der Entwicklung des sporadischen kolorektalen Karzinoms um einen multifaktoriellen Prozess handelt: erst die Akkumulation einer Vielzahl genetischer Alterationen in der Adenom-Karzinom-Sequenz führt zur Entwicklung eines invasiven, malignen Karzinoms [12;13]. Zu diesen sequenziell erworbenen onkogenetischen Veränderungen zählen die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen durch Deletion oder Mutation, die Aktivierung von Protoonkogenen durch Mutation und die dysregulierte Expression verschiedener Moleküle [5;11;14]. Die Beteiligung genetischer Mutationen in den Tumorsuppressorgenen APC, DCC, p53, 18q und dem Onkogen *K-ras* gelten als gesichert [11;15-17]. Auch die übermäßige Expression der Cyclooxygenase-2 (COX-2) ist offensichtlich an der kolorektalen Karzinogenese beteiligt. Dieses katalytische Enzym der Prostaglandinsynthese wird in bis zu 90% der sporadischen Kolonkarzinome verstärkt exprimiert [12]. Im Gegensatz zum sporadischen kolorektalen Karzinom wird beim hereditären Kolonkarzinom (s. Kap. 1.1.2) eine bestimmte genetische Mutation bereits über die Keimbahn vererbt [6].



**Abbildung 1.1** Modell der Kolonkarzinogenese (modifiziert nach Jänne *et al.*, 2000 [12])  
 Akkumulation genetischer Alterationen im Verlauf der Adenom-Karzinom-Sequenz (APC, adenomatöse Polyposis coli-Gen; COX-2, Cyclooxygenase-2; K-*ras*, p53, 18q: Tumorsuppressorgene).

#### 1.1.4 Prävention

Vorsorgemaßnahmen sind im Verlauf der Kolonkarzinogenese auf drei Stufen möglich [18]. Die *primäre Prävention* hat das Ziel, die Inzidenz kolorektaler Karzinome zu reduzieren. Insbesondere sind als auslösend geltende Umweltfaktoren zu vermeiden [19]. Nach Empfehlungen verschiedener Fachgesellschaften ist auf körperliche Aktivität und die Vermeidung von Übergewicht zu achten, Gemüse sollte den Hauptbestandteil der Ernährung ausmachen sowie Fisch und Geflügel gegenüber „rotem Fleisch“ bevorzugt werden. Die Limitierung des Alkoholkonsums auf 20g/Tag und der Verzicht auf das Rauchen werden angeraten [20]. Über die Eignung medikamentöser Maßnahmen liegen derzeit keine eindeutigen Ergebnisse vor. Aktuell untersucht wird unter anderem die Chemoprävention durch nicht-steroidale Antiphlogistika (NSAIDs) [12;19;21] – die in erster Linie als Hemmstoffe der Cyclooxygenase-1 und -2 eingesetzt werden – Östrogene, HMG-CoA-Reduktasehemmer [19] und Difluoromethylornithin (DFMO) [22]. Auch die Supplementierung der Nahrung mit Folsäure [23], Selen [24], Kalzium [25] oder Vitaminen wird auf ihre Eignung als Präventivmaßnahme getestet [12].

Eine zunehmende Rolle spielt auch die *sekundäre Prävention*. Dabei handelt es sich um Screeningmethoden zur Karzinomfrüherkennung, beispielsweise in Form des Hämocculttestes und der Kolo- oder Sigmoidoskopie [2;8]. Um die frühzeitige Behandlung von Vorläufern des Kolonkarzinoms zu ermöglichen, sollten diese Maßnahmen der Krebsvorsorge ab dem 50. Lebensjahr genutzt werden [19;26]. Die *tertiäre Prävention* richtet sich auf die Tumornachsorge, insbesondere auf die Früherkennung von Metastasen und Tumorrezidiven [18;26].

### 1.1.5 Therapie

Die Therapie kolorektaler Tumore richtet sich nach dem Stadium der Tumorprogression. Eine Komplikation kolorektaler Karzinome stellt die mögliche Bildung von Sekundärtumoren dar. Die Verbreitung abgelöster Tumorzellen kann lymphogen in regionäre und juxta-regionäre Lymphknoten erfolgen sowie als hämatogene Metastasierung über das Pfortadersystem. Die Leber ist dann mit 75% das am häufigsten betroffene Organ. Es folgen in der Häufigkeit Metastasen der Lunge (15%) sowie von Knochen und Gehirn (5%). Selten finden sich Milz-, Nieren-, Nebennieren-, Pankreas-, Mamma- und Hautmetastasen [4]. Einzig erfolgreiche Therapie der nicht-metastasierten Erkrankung ist bisher die radikale chirurgische Tumorresektion einschließlich der regionären Lymphknoten und -bahnen. Eine prä- und/oder postoperative Radiochemotherapie kann indiziert sein. Diese wird auch beim inoperablen Primärtumor empfohlen. Die Chemotherapie der fortgeschrittenen kolorektalen Karzinome als alleinige Maßnahme ist immer noch unbefriedigend. Sie wird empfohlen, wenn eine potentiell kurative Therapie, z.B. wegen inkurabler Fernmetastasen, nicht möglich ist [4;27]. Die heute eingesetzte Standardsubstanz ist das Zytostatikum 5-Fluorouracil [28]. Die individuelle Prognose für den Patienten mit kolorektalem Karzinom ist entscheidend vom Stadium der Erkrankung bei Diagnosestellung abhängig. Für die heute gebräuchlichen Therapiemaßnahmen wird eine mittlere 5-Jahres-Überlebenszeit angegeben [3].

Eine neuartige Möglichkeit der Tumorbekämpfung bietet der Einsatz von Hemmstoffen der tumorinduzierten Angiogenese. Dieses vielversprechende Therapiekonzept zielt nicht primär darauf ab, die Tumorzellen direkt zu treffen, sondern indirekt zu einem „Aushungern“ des Tumors zu führen. Kolonkarzinomzellen produzieren Wachstumsfaktoren, welche die Tumorzellen selbst sowie angrenzende Stromazellen über auto- bzw. parakrine Mechanismen

zum Wachstum anregen. Von besonderer Bedeutung ist die Wirkung dieser Signalmoleküle auf Endothelzellen. Diese werden zur Bildung von in das Tumorgewebe einspritzenden Blutgefäßen angeregt. Die Induktion der Angiogenese ermöglicht dem Tumor, seine Versorgung mit nutritiven Substanzen selbständig sicherzustellen. Sie stellt die Voraussetzung für weiteres Tumorwachstum und Metastasierung dar [29-31].

## **1.2 Physiologie und Pathophysiologie der Angiogenese**

Angiogenese ist die Neubildung von Kapillaren durch Aussprossung oder Teilung bereits bestehender Gefäße durch Migration und Proliferation von Endothelzellen [29;32;33]. Hierbei expandieren die während der embryonalen Vaskulogenese entstandenen primitiven Blutgefäßstrukturen zu einem komplexen vaskulären Netzwerk [33;34]. Grundsätzlich sind alle Körperzellen in der Lage, eine Angiogenese zu initiieren. In gesundem Gewebe findet die Neubildung von Blutgefäßen allerdings nur während der Embryogenese und im weiblichen Reproduktionssystem statt [35;36]. Eine wichtige biologische Funktion erfüllt sie während der Wundheilung [37]. Von großer Bedeutung ist die Angiogenese bei zahlreichen pathophysiologischen Vorgängen. Dazu zählen z.B. die Endometriose [38] und ophthalmologische Erkrankungen wie die diabetische Retinopathie [39]. Auch bei einigen inflammatorischen Erkrankungen verliert der Körper die Fähigkeit, den Angiogeneseprozess zu kontrollieren. So gehen beispielsweise Psoriasis und rheumatoide Arthritis mit inadäquater Neovaskularisierung einher [29;37;40].

Eine entscheidende Rolle spielen angiogene Prozesse bei der Tumorprogression [31;37]. Der Aufbau einer Blutgefäßversorgung ist essentiell für den wachsenden Tumor und stellt die Voraussetzung für die hämatogene Metastasierung dar [29;30]. Schon 1972 vermutete Judah Folkman, dass ein Tumor vaskularisiert werden muss, um über eine Größe von wenigen Kubikmillimetern hinaus wachsen zu können. Er schloss daraus, dass die Hemmung pathologischer Angiogenese eine Reduktion von Tumorgröße und Metastasenbildung zur Folge haben sollte [41]. Inzwischen wird diese Theorie von einer großen Datenmenge gestützt [42;43]. Die tumorinduzierte Angiogenese ist auch Gegenstand aktueller Forschung. Ihre Hemmung stellt sich zunehmend als potentiell äußerst wertvolle Methode der Krebstherapie dar [44]. Antiangiogene Wirkstoffe sind besonders im Kontext von Kombinationstherapien

vielversprechend. Sie könnten die therapeutische Effektivität von konventionellen Behandlungsmethoden wie der Radio- oder Chemotherapie, die auf die Tumorzellen direkt abzielen, erhöhen [45].

## 1.2.1 Die tumorinduzierte Angiogenese

### 1.2.1.1 *Angiogenic switch*

Im Initialstadium haben solide Tumore keinen Anschluss an das Blutgefäßsystem des Körpers. In dieser so genannten prävasculären Phase [46] findet die Sauerstoff- und Nährstoffversorgung durch Diffusion aus benachbarten Blutgefäßen statt. Das auch als *in situ* Karzinom bezeichnete nichtangiogene Geschwulst verbleibt infolge der limitierten nutritiven Versorgung in einer Größe von wenigen Kubikmillimetern. So kann ein solider Tumor jahrelang vermeintlich „schlafend“ im Körper existieren (*tumor dormancy*) [45]. Der Angiogeneseprozess wird von einer Vielzahl pro- und antiangiogen wirkender Faktoren (s. **Tab. 1.1**) reguliert.

Unter physiologischen Bedingungen herrscht ein Gleichgewicht zwischen diesen positiven und negativen Angiogenesemediatoren und die Neovaskularisierungen laufen streng kontrolliert ab. Während der Tumorentwicklung kommt es zu einer Störung dieses empfindlichen Gleichgewichtes [31]. Die Expression proangiogener Proteine kann durch verschiedene Faktoren induziert werden. Dazu zählen z.B. Hypoxie [47], die Aktivierung von Onkogenen oder die Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen [48-50]. Werden vermehrt Aktivatoren der Angiogenese produziert, wird das Verhältnis von pro- und antiangiogen wirkenden Faktoren zugunsten der Angiogenesestimulatoren verschoben. Dadurch kann sich das ruhende, für den Organismus i.d.R. harmlose Geschwulst, in einen endothelzell-aktivierenden Tumor wandeln. Dieses Umschalten in den sogenannten angiogenen Phänotyp wurde von Folkman schon 1971 als *angiogenic switch* bezeichnet [51] (s. **Abb. 1.2**).

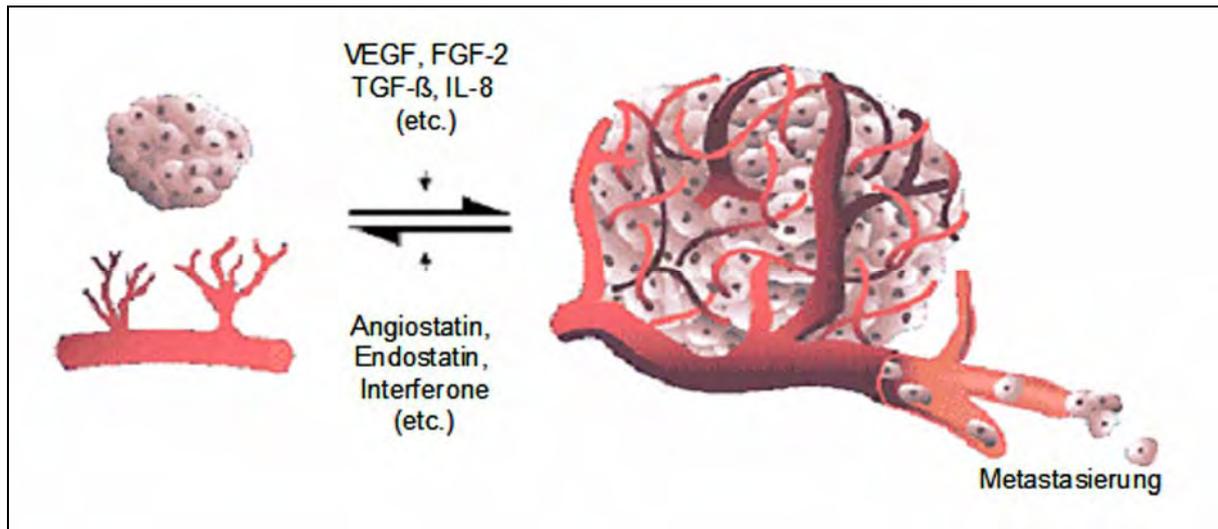
**Tabelle 1.1 Pro- und antiangiogen wirkende Faktoren [52-59]**

| <b>Proangiogene Faktoren*</b>                             | <b>Antiangiogene Faktoren</b>                   |
|---|---|
| Angiogenin  | aaAT (Antithrombin III-Fragment)                |
| Angiopoietin-1 (Ang-1)                                    | Angiopoietin-2 (Ang-2)                          |
| Cyclooxygenase-2 (COX-2)                                  | Angiostatin (Plasminogenfragment)               |
| Del-1   | Cartilage-derived inhibitor (CDI)               |
| Epidermal growth factor (EGF)                             | CD59 complement fragment                        |
| Fibroblast growth factor, acidic (aFGF)                   | Endostatin (Kollagen XVIII-Fragment)            |
| Fibroblast growth factor, basic (bFGF)                    | Fibronektin-Fragment                            |
| Follistatin   | Gro-beta  |
| Granulocyte colony-stimulating factor (G-CSF)             | Heparinasen                                     |
| Hepatocyte growth factor (HGF) <sup>#</sup>               | Heparin Hexasaccharid-Fragment                  |
| Insulin-like growth factor-1 (IGF-1)                      | Human chorionic gonadotropin (hCG)              |
| Interleukin-3 (IL-3)                                      | Interferon $\alpha$ , $\beta$ , $\gamma$        |
| Interleukin-8 (IL-8)                                      | Interferon inducible protein (IP-10)            |
| Leptin  | Interleukin-4 (IL-4)                            |
| Midkine   | Interleukin-12 (IL-12)                          |
| Placental growth factor (PIGF)                            | Kringel 5 (Plasminogenfragment)                 |
| Platelet-derived endothelial cell growth factor (PD-ECGF) | Tissue inhibitors of metalloproteinases (TIMPs) |
| Platelet-derived growth factor-BB (PDGF-BB)               | Troponin I                                      |
| Pleiotrophin (PTN)  | 2-Methoxyestradiol                              |
| Progranulin   | Placental ribonuclease inhibitor                |
| Proliferin  | Plasminogen activator inhibitor-I (PAI-I)       |
| Transforming growth factor-alpha (TGF- $\alpha$ )         | Platelet factor-4 (PF-4)                        |
| Transforming growth factor-beta (TGF- $\beta$ )           | Prolaktin (16kD Fragment)                       |
| Tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ )              | Proliferin-related protein (PRP)                |
| Vascular endothelial growth factor (VEGF) <sup>##</sup>   | Retinoide                                       |
|   | Tetrahydrocortisol-S                            |
|   | Thrombospondin-1 (TSP-1)                        |
|   | Transforming growth factor beta (TGF- $\beta$ ) |
|   | Vasculostatin                                   |
|   | Vasostatin (Calreticulinfragment)               |

\* Faktoren, von denen bekannt ist, dass sie Endothelzellwachstum und -bewegung aktivieren

# Synonym: scatter factor (SF)

## Synonym: vascular permeability factor (VPF)

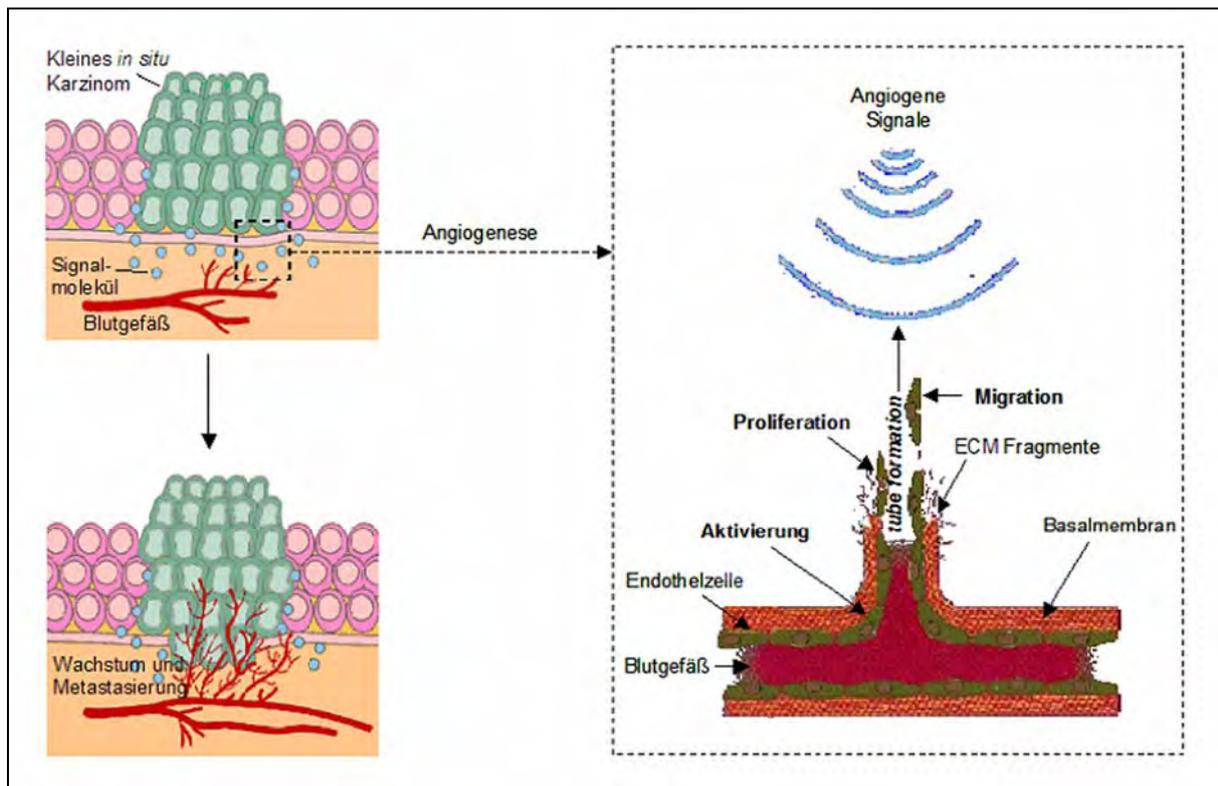


**Abbildung 1.2** *Angiogenic switch* vom nichtangiogenen Tumor zum angiogenen Phänotyp [60]

Angiogeneseinduktion während der Tumorentwicklung: Störung des Gleichgewichtes aus pro- und antiangiogen wirkenden Faktoren (FGF-2, basic fibroblast growth factor; IL-8, Interleukin-8; TGF- $\beta$ , transforming growth factor- $\beta$ ; VEGF, vascular endothelial growth factor).

### 1.2.1.2 Der Angiogeneseprozess

Sobald ein Tumor eine bestimmte Größe überschritten hat – hier schwanken die Literaturangaben zwischen 1-3 mm<sup>3</sup> [30;37;61] – sendet er proangiogene Signalmoleküle aus. So wird z.B. durch die Hypoxie der Zellen im Tumorrinneren die Ausschüttung von Wachstumsfaktoren wie dem *vascular endothelial growth factor* (VEGF) und dem *basic fibroblast growth factor* (bFGF, FGF-2) [47;62;63] induziert, welche durch Diffusion zu bereits existierenden Blutgefäßen gelangen (s. **Abb. 1.3**). Dort binden sie an spezifische Oberflächenrezeptoren von Endothelzellen, die dadurch aktiviert werden [62;64]. Es wird eine komplexe Signalkaskade ausgelöst, die unter anderem die Expression von Matrixmetalloproteinasen (MMP) und Plasminogenaktivatoren zur Folge hat. Diese und weitere proteolytische Enzyme bauen die extrazelluläre Matrix (ECM) und die Basalmembran der Blutgefäße ab. Die Endothelzellen beginnen sich zu teilen (Proliferation), lösen sich aus ihrem Zellverband und wandern durch die von den Proteasen neugebildeten Lücken in Richtung des angiogenen Stimulus (Migration). Von den aktivierten Endothelzellen exprimierte membranständige Adhäsionsmoleküle (Integrine) vermitteln die Migration und Reifung der Endothelzellen, indem sie für den notwendigen Kontakt zu Bestandteilen der



**Abbildung 1.3** Der Angiogeneseprozess (modifiziert nach Kelly, 2000 [65]; ECM, extrazelluläre Matrix).

ECM sorgen [62]. Die zunächst als sogenannte Gefäßsprossen heranwachsenden Endothelzellen bilden im weiteren Verlauf ein Lumen und die Basalmembran wird neu gebildet. Infolge Sekretion von Wachstumsfaktoren, z.B. des *platelet-derived growth factors* (PDGF), werden Perizyten rekrutiert, die zum Aufbau eines umgebenden Stützgewebes beitragen [66]. Charakteristisch für tumorassoziierte Gefäße ist dabei die nur schwache Ausprägung der ECM mit lediglich vereinzelt vorliegenden Perizyten und Myozyten [67]. Die neu formierten, labileren Kapillaren bilden Anastomosen und verbinden sich zu Gefäßnetzwerken, wodurch die Blutzirkulation ermöglicht wird. Lebensnotwendige Nährstoffe und Sauerstoff können nun zu dem Gewebe transportiert werden, welches ursprünglich die proangiogenen Wachstumsfaktoren freigesetzt hat. Die entarteten Zellen sind nun imstande, ungehindert zu proliferieren [68]. Durch den Anschluss des Tumorzellverbandes an das Gefäßsystem des Körpers wird auch die hämatogene Metastasierung ermöglicht [69]. Da die Bildung von Sekundärtumoren eine weit häufigere Todesursache bei Krebspatienten darstellt als das Primärgeschwulst selbst, stellt die Unterbrechung dieser Entwicklung eine große therapeutische Herausforderung dar.

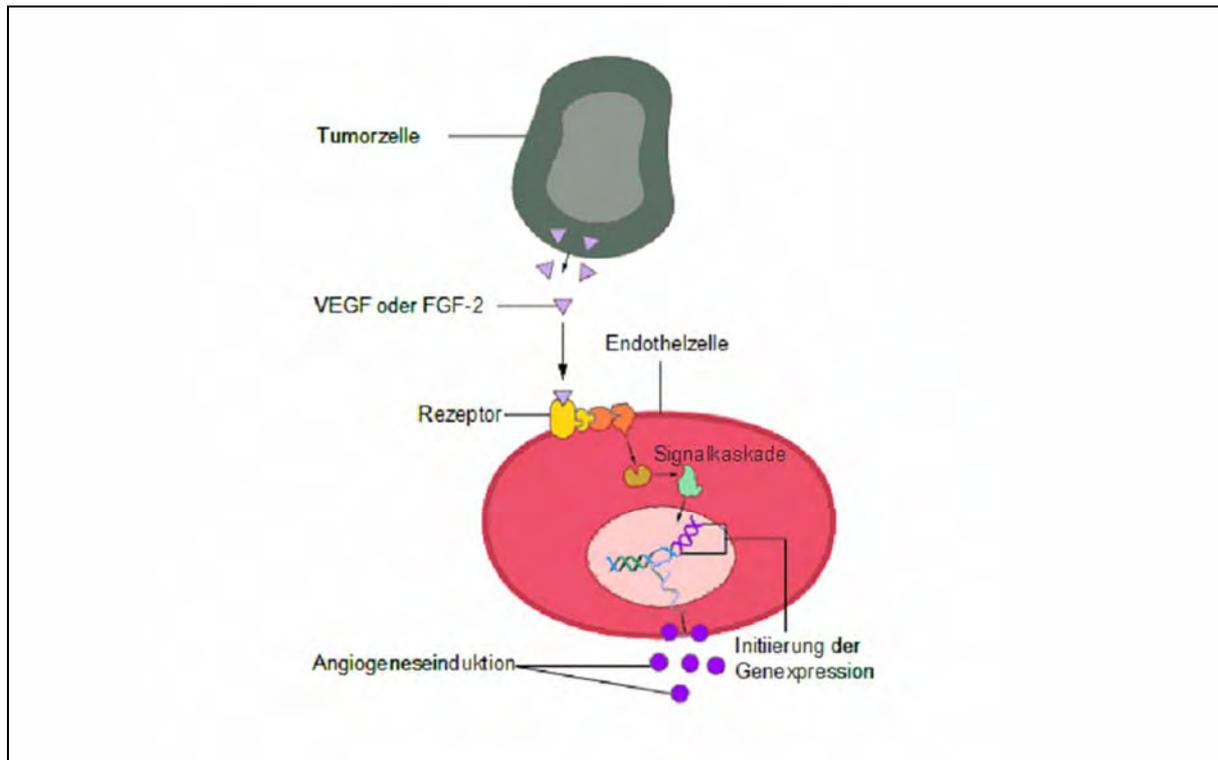
## 1.2.2 Die Wachstumsfaktoren FGF-2 und VEGF

Wachstumsfaktoren (*growth factors*) sind körpereigene Polypeptide, die die Genaktivität in bestimmten DNA-Abschnitten aktivieren und dadurch Zellproliferation und Zellteilung stimulieren. Ihre Wirkung wird häufig durch Membranrezeptoren vermittelt, die eine Tyrosinkinase-Aktivität besitzen. An intrazellulären Zielproteinen werden dadurch Phosphorylierungen ausgelöst, wodurch diese Zielproteine genregulatorische Funktionen erhalten. Auch der Prozess der Blutgefäßneubildung wird durch die Bindung von Wachstumsfaktoren an ihre entsprechenden Rezeptoren eingeleitet. Im weiteren Verlauf werden die Endothelzellen zu Proliferation und Migration angeregt [29;70]. **Abbildung 1.4** zeigt ein Schema der Wachstumsfaktor-vermittelten Induktion der Angiogenese.

Unter einer Vielzahl als proangiogen geltender Faktoren (vgl. **Tab.1**) stellen FGF-2 und vor allem VEGF die bedeutendsten Mediatoren der Tumorangiogenese dar.

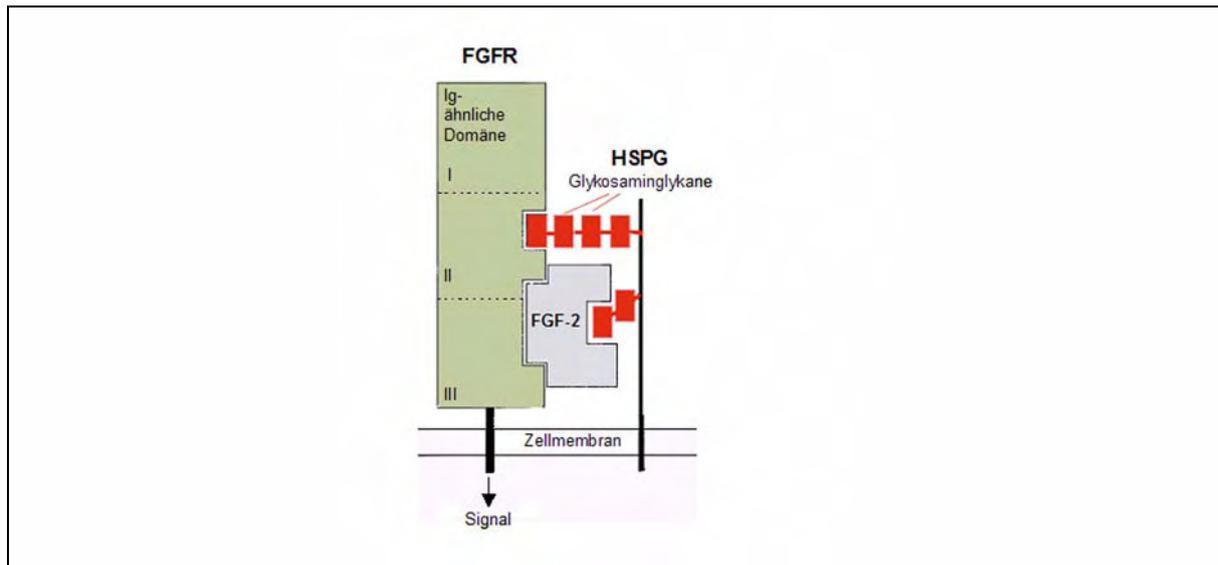
### 1.2.2.1 Der Wachstumsfaktor FGF-2

Die Familie der *fibroblast growth factors* (FGFs) besteht aus wenigstens 23 heparinbindenden Faktoren, die zu ca. 30-70% in ihrer primären Aminosäuresequenz identisch sind [71]. Die klassischen FGFs sind FGF-1 (acidic FGF, aFGF; pH 5,6) und FGF-2 (basic FGF, bFGF; pH 9,6) [72]. Bei FGF-2 handelt es sich um ein Einzelstrangpeptid aus 146 AS, zu 55% homolog in der Sequenz ist FGF-1 mit 140 AS. Die biologische Aktivität betreffend ist FGF-2 30-100 mal stärker als FGF-1 [73]. Dementsprechend beschäftigt sich die Mehrzahl der biologischen Studien mit der basischen Form. Es ist davon auszugehen, dass FGF-2 evolutionsgeschichtlich extrem gut konserviert wurde, da sich das bovine und das humane FGF-2 in nur 2 AS unterscheiden (AS-Sequenz-Homologie von 98,7%) [74]. Das mittlere Molekulargewicht von FGF-2 liegt je nach Isoform zwischen 18-25 kDa [75-77]. FGF-2 wird in fast allen gesunden wie entarteten Geweben und Zellen mesodermaler und neuroektodermaler Herkunft gefunden. So kommt FGF-2 beispielsweise in Gehirn, Hypophyse, Retina, Niere, Plazenta, Knochen- und Knorpelgewebe, Prostata, Kapillar-endothelien, Granulosazellen und Myoblasten ebenso vor wie in Chondrosarkomen und Melanomen sowie in kultivierten Tumorzellen von Rhabdomyosarkomen, Hepatomen und Retinoblastomen [73;78].



**Abbildung 1.4 Die Wachstumsfaktor-induzierte Tumorangiogenese** (modifiziert nach Kelly, 2000 [65]; FGF-2, basic fibroblast growth factor ; VEGF, vascular endothelial growth factor).

Im Gegensatz zu anderen sezernierten Wachstumsfaktoren weisen FGFs keine zytoplasmatischen Sequenzen für den extrazellulären Transport auf [72;79;80]. Statt dem klassischen Weg der Sekretion über Endoplasmatisches Retikulum und Golgi-Apparat [81] werden alternative Modelle zum Transport aus der Zelle diskutiert. FGFs binden mit hoher Affinität an Heparansulfatproteoglykane (HSPGs), die auch als Co-Rezeptoren fungieren [82]. Sie befinden sich an der Oberfläche, in der Basalmembran und in der extrazellulären Matrix von Endothelzellen und der meisten anderen Zellarten [83;84]. Es bildet sich ein Reservoir des Wachstumsfaktors, aus dem FGF-2 in regulierter Weise – z.B. durch Heparanasen oder das *FGF-binding protein* (FGF-BP) – freigesetzt werden kann [82;85;86]. FGF-2 bleibt demnach membrangebunden, solange kein Signalpeptid vorhanden ist. Möglicherweise wird FGF-2 – insbesondere während Wundheilung und Tumorentwicklung – durch Heparansulfat-abbauende Enzyme (Heparanasen) aktiviert und so die Blutgefäßneubildung vermittelt [87;88]. Als weitere Freisetzungsmechanismen kommen physikalische Gewebeschädigungen wie Wunden [89], ionisierende Strahlen [90] sowie Zelltod in Betracht [91]. Die biologischen Wirkungen der FGFs werden über vier

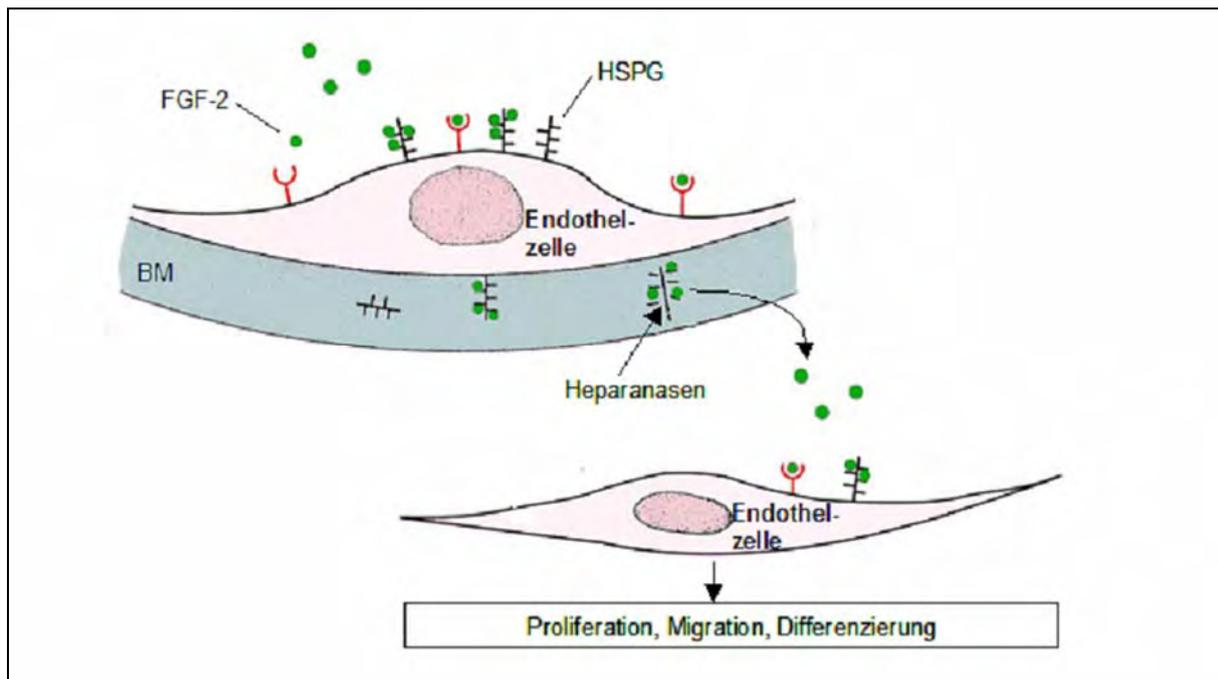


**Abbildung 1.5 Modell der Interaktion zwischen FGF-2, seinem Rezeptor und dem als Co-Rezeptor fungierenden Heparansulfatproteoglykan**  
(modifiziert nach Presta und Rusnati, 2000 [92], <http://www.med.unibs.it/~airc/gfs.html>) FGF-2, basic fibroblast growth factor; FGFR, basic fibroblast growth factor receptor; HSPG, Heparansulfatproteoglykan; Ig, Immunglobulin).

strukturverwandte Rezeptortyrosinkinasen vermittelt (FGF-Rezeptor 1-4, FGFR 1-4) [93]. Alle Zellarten, die auf FGF-1 oder FGF-2 reagieren, tragen diese hochaffinen Zelloberflächenrezeptoren [72]. Drei extrazelluläre Immunglobulin-ähnliche Domänen bilden zusammen mit den HSPGs die Bindungsstelle für den Wachstumsfaktor. Eine Transmembrandomäne verbindet den intra- und den extrazellulären Teil (s. **Abb. 1.5**). Die Bindung des Liganden induziert Dimerisierung des Rezeptors. Nach Aktivierung des FGF-Rezeptors erfolgt die Autophosphorylierung seiner zytoplasmatischen Tyrosinkinase-Domäne [94;95]. Durch die FGFR-Stimulierung wird eine intrazelluläre Signalkaskade ausgelöst, die in der spezifischen Zellantwort auf das Signalpeptid resultiert. FGF-2 reguliert so zahlreiche biologische Funktionen sowohl unter physiologischen als auch pathologischen Bedingungen [96].

### ***Funktionen von FGF-2***

FGF-2 ist ein multipotenter Faktor, der wie alle Mitglieder der FGF-Polypeptid-Familie vorwiegend auf von Mesoderm und Neuroektoderm abstammende Zellen und Gewebe wirkt [97;98].



**Abbildung 1.6** Autokrine und parakrine Wirkung von FGF-2 (modifiziert nach Klagsbrun, 1990 [99]; FGF-2, basic fibroblast growth factor; HSPG, Heparansulfatproteoglykan).

So stimuliert FGF-2 das Wachstum von Fibroblasten, Myeloblasten, Osteoblasten, Nervenzellen, Endothelzellen und vielen anderen Zelltypen. Der Wachstumsfaktor zeigt akute sowie langanhaltende Effekte auf die Morphologie und das Wachstumsverhalten seiner Zielzellen. Ferner erhöht er deren migratorische Aktivität [73;100-102]. Er stellt auch einen Differenzierungsfaktor für verschiedene Zellarten dar (z.B. Chondrozyten, Astrozyten, Oligodendrozyten), kann jedoch auch Differenzierung verzögern (z.B. bei normalen diploiden Myoblasten) [103]. FGF-2 ist in der Lage, ausdifferenzierte Zellen vor Apoptose zu schützen und die Lebensdauer von Zellen in Zellkulturen deutlich zu erhöhen. Aus diesem Grund wird FGF-2 auch als *survival-factor* bezeichnet [97;100;104].

Eine wichtige Funktion hat FGF-2 für Wachstums- und Reifungsprozesse während der Embryonal- und der Fetalphase. Hier ist er u.a. an Keimwachstum, Gastrulation, Neurulation und Organogenese beteiligt. Im adulten Gewebe fördert der Wachstumsfaktor insbesondere Erneuerungsprozesse, indem er das Überleben neuronaler Stammzellen, Neuronenmigration, Wundheilung und Geweberegeneration unterstützt [97;105]. Zu den physiologischen Wirkungen von FGF-2 zählen weiterhin die Nitritoxidase-vermittelte Vasodilatation und Hypotension [106] sowie die Aufrechterhaltung der Homöostase [96]. FGF-2 ist auch ein Kompetenzfaktor der normalen Hämatopoese [107].

Die Angiogeneseinduktion stellt einen wichtigen Aspekt der biologischen Aktivität von FGF-2 dar. Sie ist essentieller Bestandteil zahlreicher Entwicklungsschritte während der Embryonalentwicklung und in späteren Gewebeumbildungsprozessen. FGFs gehörten zu den ersten Molekülen, von denen beschrieben wurde, dass sie Proliferation, Migration und Differenzierung von vaskulären Zellen *in vitro* stimulieren. In verschiedenen *in vivo* Studien konnte bestätigt werden, dass FGF-2 einen potenten angiogenen Faktor darstellt [105;108;109]. FGF-2 wird auch von Endothelzellen selbst exprimiert [110;111]. Hier induziert er die Produktion von Kollagenasen und Plasminogenaktivatoren, was zum Abbau von Basalmembran und ECM beiträgt [112]. Der Wachstumsfaktor kann demnach sowohl über autokrine als auch über parakrine Mechanismen angiogenesefördernd wirken [103] (s. **Abb. 1.6**). FGF-2 zeigt *in vitro* starke synergistische Effekte mit VEGF. Dies betrifft die Induktion von Endothelzellproliferation und -migration sowie die Bildung tubulärer Strukturen (kapilläre *tube formation*) [113].

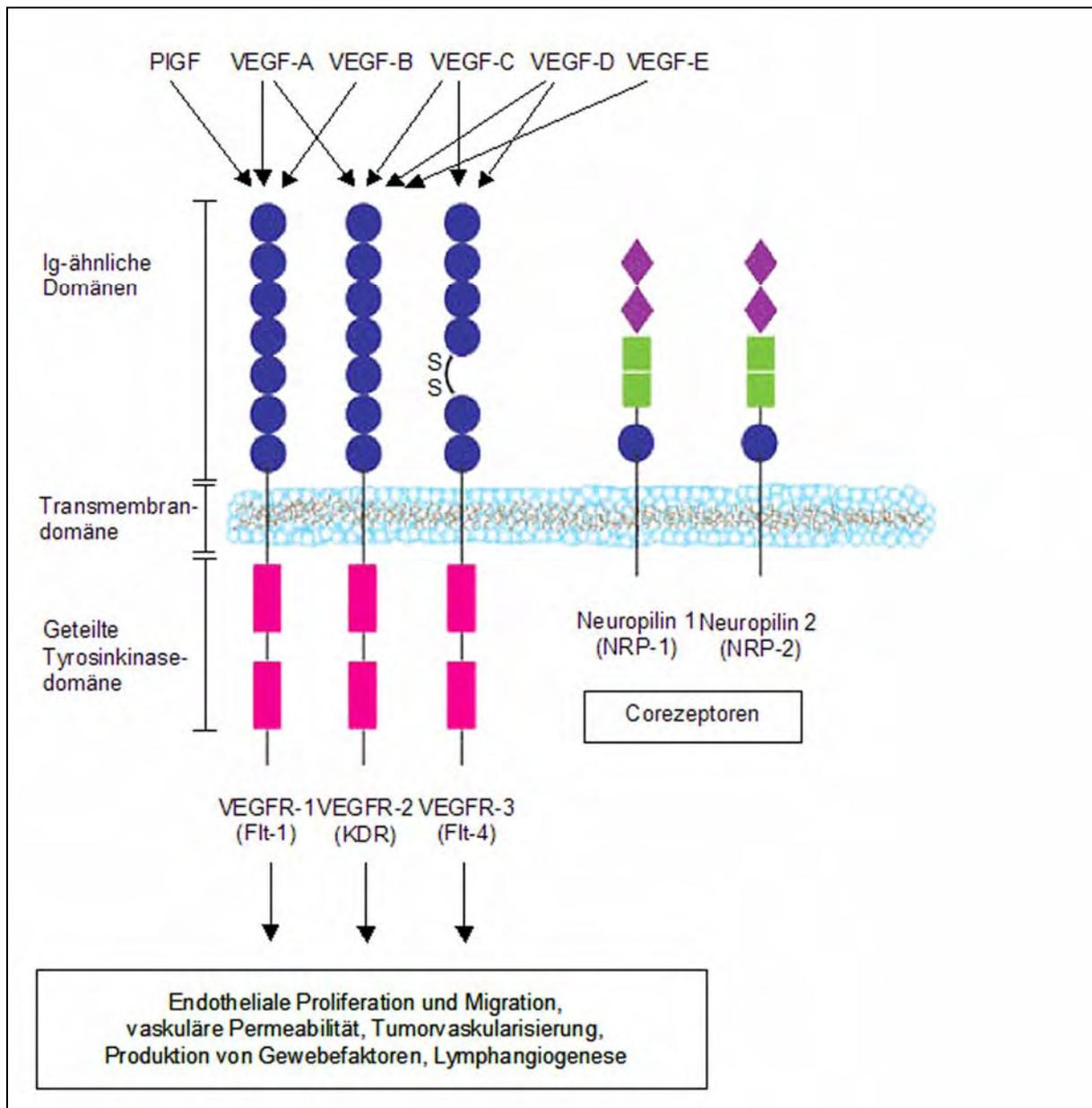
### 1.2.2.2 Der Wachstumsfaktor VEGF

Derzeitig sind sechs Mitglieder aus der Familie der *vascular endothelial growth factors* (VEGFs) beschrieben (s. **Abb. 1.7**). Dazu zählen VEGF-A (im folgenden bezeichnet als VEGF), VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, der *placenta growth factor* (PlGF) und virale Homologe von VEGF, zusammen als VEGF-E bezeichnet [114-116]. Die Aktivität des PlGF ist möglicherweise auf Umbildungsprozesse im ausgereiften Blutgefäßsystem beschränkt [117]. VEGF-C scheint vor allem für die Entwicklung des Lymphgefäßsystems [118], VEGF-B vor allem für die Ausbildung der Koronarvaskularisierung verantwortlich zu sein [119]. Über die physiologische Rolle von VEGF-D ist noch wenig bekannt [120].

Der Hauptvertreter VEGF gilt als potentester Stimulus für die Induktion der Angiogenese. Er reguliert neben der Proliferation auch die Permeabilität von Gefäßen und wurde daher ursprünglich als *vascular permeability factor* (VPF) bezeichnet [121]. Natives VEGF ist ein basisches, heparinbindendes Glykoprotein mit einem Molekulargewicht von 45 kDa [122]. Fünf verschiedene Homodimere von VEGF (VEGF<sub>121</sub>, VEGF<sub>145</sub>, VEGF<sub>165</sub>, VEGF<sub>189</sub>, VEGF<sub>206</sub>) konnten bislang durch alternatives Spleißen identifiziert werden [123;124]. VEGF<sub>121</sub> bindet weder an Heparin noch an die extrazelluläre Matrix (ECM) und ist frei diffusionsfähig [125]. Die größeren Isoformen beinhalten zunehmend basische und heparinbindende Reste und sind vermehrt an Zelloberflächen und heparinhaltige

Proteoglykane der ECM gebunden [124]. VEGF<sub>121</sub> und VEGF<sub>165</sub> sind serumlösliche Proteine und werden in das Medium der produzierenden Zelle sezerniert [63;125]. VEGF<sub>165</sub> stellt die vorherrschende und vermutlich biologisch aktivste Form dar [123;124]. Diese Isoform wird in verschiedenen Geweben (z.B. Gehirn, Niere, Leber, Milz) sowie den meisten Zellarten gebildet [115]. Zu diesen zählen beispielsweise Monozyten, Makrophagen, Mastzellen, T-Lymphozyten, glatte Muskelzellen, Keratinozyten und Osteoblasten. Auch entartete Zellen produzieren VEGF<sub>165</sub>, insbesondere hochmaligne und schnell proliferierende Tumorzellen [126-128]. Im Gegensatz zu FGF-2 wird VEGF von seinen Zielzellen selbst – also den Endothelzellen – nicht sezerniert [129].

Alle Mitglieder der VEGF-Familie entfalten ihre Wirkung über die Bindung an die Rezeptortyrosinkinasen Flt-1 (VEGFR-1), KDR (VEGFR-2) und Flt-4 (VEGFR-3), deren Expression im adulten Organismus weitgehend auf Endothelien beschränkt ist [120]. Hierbei finden sich VEGFR-1 und VEGFR-2 überwiegend in Blutgefäßen. Sie werden nur von wenigen anderen Zellarten, z.B. hämatopoetischen Ursprungs, exprimiert [130]. Auch in neoplastischen Zellen konnten diese Rezeptoren nachgewiesen werden. Dies gilt z.B. für Zellen maligner Melanome [131]. VEGFR-3 ist im adulten Organismus ausschließlich in lymphatischen Gefäßen nachzuweisen [130;132]. Die wichtigsten angiogenen Effekte des VEGF werden offensichtlich über den VEGFR-2 vermittelt [133]. Die VEGF-Rezeptoren verfügen über sechs (VEGFR-3) bzw. sieben (VEGFR-1, -2) extrazelluläre Immunglobulin-ähnliche Domänen, die der Ligandenbindung dienen. Auf eine Transmembrandomäne folgt eine zytoplasmatische Domäne mit einer konservierten Tyrosinkinase sowie Sequenzen für positive und negative Rezeptorregulation [134;135]. Die Ligandenbindung löst Dimerisierung der Rezeptoren aus. Die nachfolgende Trans-/Autophosphorylierung der Rezeptoren an Tyrosinresten stellt den Ausgangspunkt für die weitere zelluläre Signalleitung zum Kern dar. Sie resultiert in der spezifischen Zellantwort auf den Wachstumsfaktor [123]. Es existieren einige zusätzliche Corezeptoren für VEGF, z.B. die Neuropiline, die in erster Linie die Bindung an die Hauptrezeptoren zu modulieren scheinen. Eine Rolle in der Signaltransduktion kann aber nicht ausgeschlossen werden [136].



**Abbildung 1.7 Die VEGF-Familie und ihre Rezeptoren** ([137], modifiziert; Ig, Immunglobulin; PIGF, placenta growth factor; VEGF, vascular endothelial growth factor; VEGFR, vascular endothelial growth factor receptor).

### *Funktionen von VEGF*

VEGF gilt als einer der bedeutendsten Faktoren in der Regulation der Blutgefäßneubildung [123]. Die angiogene Potenz von VEGF konnte sowohl *in vitro* [138] als auch in verschiedenen *in vivo* Modellen [139-141] nachgewiesen werden. Der Wachstumsfaktor ist an zahlreichen angiogenesefördernden zellulären Mechanismen beteiligt. VEGF wirkt mitogen auf arterielle, venöse und lymphatische Endothelzellen. Auf die Proliferation anderer

Zellarten besteht dagegen kein signifikanter Einfluss. Die hohe Spezifität von VEGF für Endothelzellen ist einzigartig unter den proangiogenen Faktoren [141]. Über verschiedene antiapoptotische Signalwege unterstützt VEGF das Überleben von Endothelzellen, er fördert die Formation neuer Blutgefäße und stellt ihre Integrität sicher [142-144]. VEGF kann deshalb wie FGF-2 als *survival-factor* bezeichnet werden [145].

VEGF fördert die Expression von Plasminogenaktivatoren, Kollagenasen und MMP. Diese proteolytischen Enzyme sind an der Degradierung von Basalmembran und ECM beteiligt und schaffen so die Voraussetzung für die endotheliale Zellmigration [146-148]. Auch die Wanderung der Endothelzellen selbst wird über intrazelluläre Signalwege durch den Wachstumsfaktor stimuliert. Gleiches gilt für die nachfolgende Bildung tubulärer Strukturen (*tube formation*) [149]. Eine der Hauptfunktionen von VEGF ist nach Dvorak *et al.* die Erhöhung der Gefäßpermeabilität für Plasmaproteine. Dies führt zur Bildung eines extravaskulären Fibringels. Es dient als Matrix für das Wachstum von Endothelzellen beispielsweise während der Wundheilung [150-152]. Weitere Wirkungen von VEGF sind – in erster Linie scheinbar vermittelt durch von Endothelzellen abstammende Nitritoxidsynthese – die Induktion von Vasodilatation, Tachykardie und Hypotension [153;154]. Eine herausragende Bedeutung hat VEGF während der embryonalen Vaskulogenese und Angiogenese. Wie *in vivo* Studien belegten, führt das Fehlen nur eines VEGF-Allels aufgrund von Entwicklungsstörungen des kardiovaskulären Systems zum embryonalen Tod der Versuchstiere [155;156]. Noch bis einige Wochen *post partum* verläuft eine Inaktivierung von VEGF letal [157]. Zu späteren Zeitpunkten sind die Auswirkungen weit weniger traumatisch. Betroffen sind dann offensichtlich nur Strukturen, die vaskulären Umbildungsprozessen unterliegen [158]. Von Gerber *et al.* wurde die Regulation enchondraler Knochenbildung und longitudinalen Knochenwachstums als Aufgabe von VEGF in der postnatalen Entwicklung beschrieben [159]. Im adulten, ausgereiften Organismus ist die VEGF-vermittelte Angiogenese für die zyklische Blutgefäßproliferation im weiblichen Reproduktionssystem essentiell. So sind die Vaskularisierung des Corpus luteum, das Wachstum endometrialer Gefäße sowie die Implantation des Embryos VEGF-abhängige Abläufe [63;160]. Auch die angiogene Aktivität während der proliferativen Phase der Wundheilung wird durch VEGF induziert [161].

### 1.2.3 Der Transkriptionsfaktor HIF-1 $\alpha$

Der Transkriptionsfaktor *hypoxia inducible factor-1* (HIF-1) ist der Hauptregulator der O<sub>2</sub>-Homöostase. HIF-1 ist ein Heterodimer, bestehend aus den Untereinheiten HIF-1 $\alpha$  und HIF-1 $\beta$ . HIF-1 $\beta$  wird kontinuierlich exprimiert. HIF-1 $\alpha$  ist die O<sub>2</sub>- und Wachstumsfaktor-regulierte Komponente und weist unter normoxischen Bedingungen in den meisten Zellen geringe Werte auf. Mit sinkender O<sub>2</sub>-Konzentration steigt die Expression von HIF-1 $\alpha$  exponentiell an [162;163]. So vermittelt HIF-1 $\alpha$  in transformierten Zellen die Synthese proangiogener Faktoren wie VEGF und FGF-2, um über die Induktion der Tumervaskularisierung eine adäquate Sauerstoffversorgung des Tumors sicherzustellen [47;62;63;123].

#### *Regulation der HIF-1 $\alpha$ Aktivität unter physiologischen Bedingungen*

Die Aktivität von HIF-1 $\alpha$  wird bestimmt durch die Bilanz aus pO<sub>2</sub>-unabhängiger Proteinsynthese und pO<sub>2</sub>-abhängiger Proteinstabilisierung (s. **Abb. 1.8**). Die Synthese des Transkriptionsfaktors wird durch Bindung von Wachstumsfaktoren an geeignete Zelloberflächenrezeptoren (z.B. IGF- und EGF-Rezeptoren) vermittelt. Die Stimulation von Rezeptortyrosinkinasen aktiviert die Phosphatidylinositol 3-Kinase (PI3-Kinase/PI3K) und nachfolgend die Serin/Threonin Kinase AKT (Proteinkinase B). Die Stimulation dieses PI3K/AKT Signaltransduktionsweges führt über Zwischenstufen zu einer gesteigerten Translationsrate der HIF-1 $\alpha$  mRNA mit konsekutiver Proteinexpression [48;164;165]. Unter normoxischen Bedingungen wird der Transkriptionsfaktor mit einer Halbwertszeit von < 5 min rasch degradiert [163]. Der Abbau erfolgt über das Ubiquitin-Proteasom-System. Prolylhydroxylasen hydroxylieren zwei Prolinreste (Pro402, Pro564) des HIF-1 $\alpha$ -Proteins. Diese O<sub>2</sub>-abhängige enzymatische Modifikation ist Voraussetzung für die Bindung des Tumorsuppressorproteins von Hippel-Lindau (pVHL). Das pVHL stellt die Erkennungskomponente der E3 Ubiquitin-Protein-Ligase dar, welche die HIF-1 $\alpha$  Untereinheit für die proteasomale Degradierung durch das 26S Proteasom markiert [166-169].

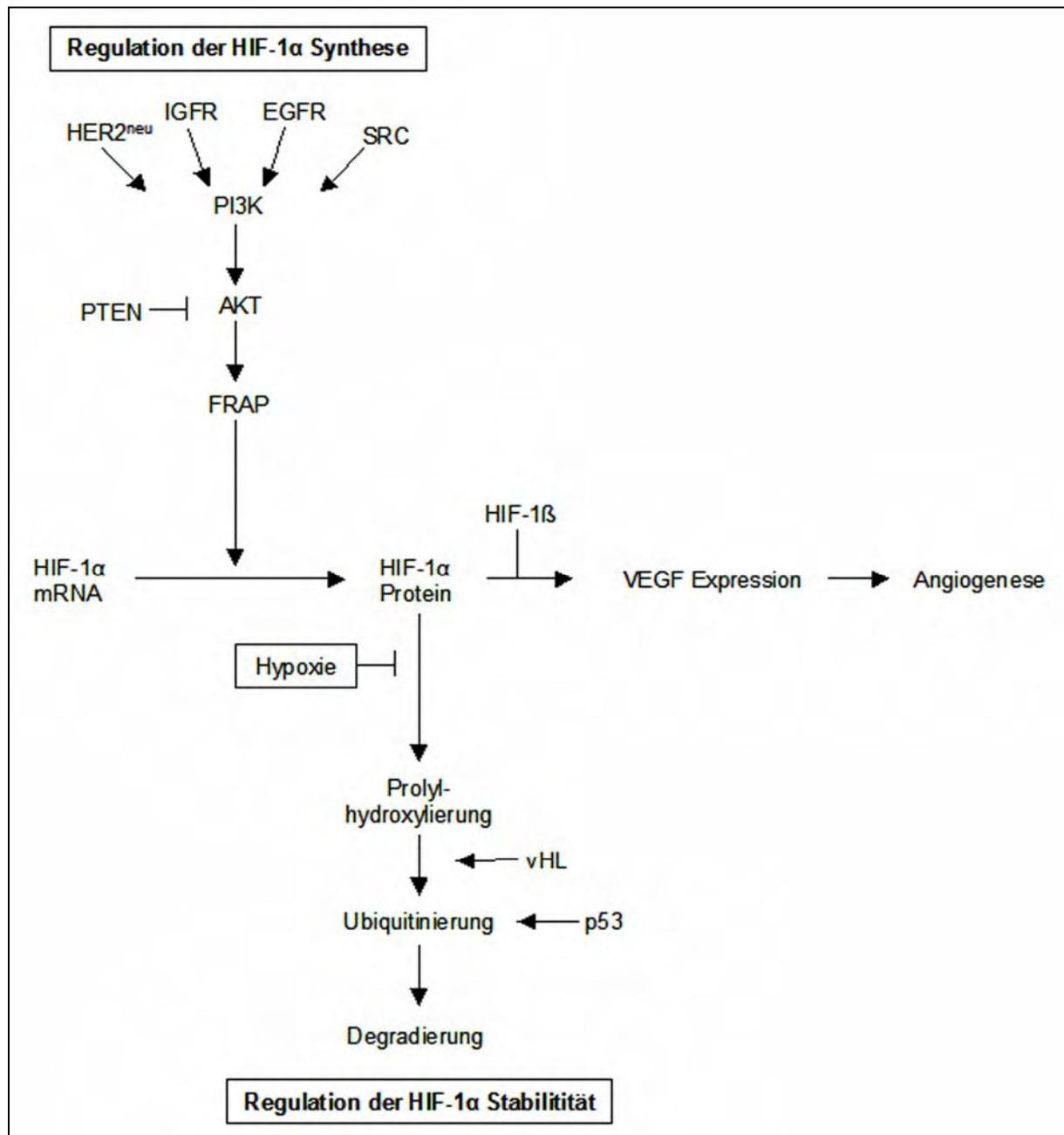


Abbildung 1.8

**Die Regulation der HIF-1 $\alpha$  Aktivität unter physiologischen und pathologischen Bedingungen** (modifiziert nach Semenza 2002 [170]; EGFR, epidermal growth factor receptor; FRAP, FKBP-rapamycin associated protein, mTOR; HIF-1 $\alpha$ , hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ ; IGFR, insulin-like growth factor-1 receptor; PI3K, Phosphatidylinositol 3-Kinase; VEGF, vascular endothelial growth factor; p53, vHL (von Hippel-Lindau), PTEN: Tumorsuppressorgene; *v-src*, HER2<sup>neu</sup>: Onkogene).

### ***HIF-1 $\alpha$ Aktivierung in Tumoren***

HIF-1 $\alpha$  wird in den meisten humanen Tumorarten übermäßig exprimiert. Auch in prämaligen Läsionen des Kolons (Kolonadenomen), in kolorektalen Karzinomen sowie ihren Metastasen ist eine gesteigerte HIF-1 $\alpha$  Expression festzustellen [171;172]. Solide Tumore mit verstärkter HIF-1 $\alpha$  Aktivität weisen erhöhte Wachstumsraten auf und gelten als prognostisch ungünstig [172;173]. Ursache für die Stabilisierung und Aktivitätssteigerung von HIF-1 $\alpha$  ist hauptsächlich die geringe Sauerstoffspannung in nekrotischen Arealen solider Tumore. Hypoxie bewirkt die intrazelluläre Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$ . Die limitierte O<sub>2</sub>-Verfügbarkeit beschränkt die Aktivität der Prolyhydroxylasen. Folglich wird die Bindung des pVHL verhindert und die Ubiquitinierung von HIF-1 $\alpha$  unterdrückt. Das HIF-1 $\alpha$  Protein akkumuliert im Zytosol und wird anschließend in den Zellkern transportiert. Hier bildet es einen aktiven Komplex mit HIF-1 $\beta$  und aktiviert die Transkription von O<sub>2</sub>-regulierten Zielgenen [173]. Zusätzlich zu diesem dominierenden Einfluss des pO<sub>2</sub> beeinflussen genetische Alterationen die HIF-1 $\alpha$  Funktion. Mutationen in Tumorsuppressorgenen (p53, vHL, PTEN) und Onkogenen (*v-src*, HER2<sup>neu</sup>, H-RAS) induzieren die übermäßige Expression oder Aktivität von HIF-1 $\alpha$ . Die geschieht zum einen über eine verminderte Ubiquitinierung, z.B. bei Funktionsverlust des Tumorsuppressorgens vHL. Zum anderen führt eine Stimulation des PI3K/AKT Signalweges, beispielsweise durch Onkogene oder durch Funktionsverlust des Tumorsuppressors PTEN, zu einer gesteigerten HIF-1 $\alpha$  Expression [48;49;174-177] (s. **Abb. 1.8**).

### 1.2.4 Strategien zur Hemmung der tumorinduzierten Angiogenese

Der erste endogene Hemmstoff der Angiogenese wurde 1975 von Henry Brehm und Judah Folkman in Knorpelgewebe entdeckt. Inzwischen sind mehr als 300 Inhibitoren bekannt. Zahlreiche sind natürlichen Ursprungs (z.B. aus Pilzen, Korallen, grünem Tee, Kräutern), mindestens 30 konnten aus dem menschlichen Organismus isoliert werden [52]. Es werden verschiedenartige Ansätze verfolgt, Angiogeneseinhibitoren in der Tumorthherapie nutzbar zu machen. Im Folgenden soll eine Übersicht über die wichtigsten Strategien gegeben werden.

#### *Endogene Angiogeneseinhibitoren*

Der Einsatz natürlich vorkommender Inhibitoren der Angiogenese wurde durch O'Reilly *et al.* in die Wege geleitet, der Angiostatin als ersten endogenen Hemmstoff tumorbedingter Endothelzellproliferation und Angiogenese identifizierte [178]. Im Tierversuch konnte gezeigt werden, dass Angiostatin das Wachstum verschiedener humaner Tumore und deren Metastasierung unterdrückt [179;180].

Endostatin ist ein weiterer physiologischer Hemmstoff, der wie Angiostatin interessanterweise von den transformierten Zellen selbst produziert wird. Endostatin hemmt spezifisch die Endothelzellproliferation *in vitro*. *In vivo* Versuche belegen das Hemmungspotential der Substanz beispielsweise beim EOMA Hämangioendotheliom, Lewis-Lungenkarzinom, T241-Fibrosarkom und der B16F10 Melanomzelllinie [43;181]. Desweiteren führten wiederholte Behandlungen mit Endostatin oder Angiostatin auch nach Absetzen zu einer anhaltenden *tumor dormancy* [42;180]. Vielversprechende Ergebnisse wurden mit Interferon-alpha (IFN- $\alpha$ ), welches die Expression von FGF-2 vermindert [182], bei der Behandlung juveniler Hämangiome erzielt [183].

Als wichtigster physiologischer Inhibitor der Angiogenese *in vitro* und *in vivo* gilt Thrombospondin-1 (TSP-I). Er wird fortwährend von gesunden Zellen gebildet, seine Expression wird von dem Tumorsuppressorgen p53 reguliert [184]. Ein großer Vorteil endogener Angiogeneseinhibitoren liegt in ihren geringen Nebenwirkungen, sie wirken nicht toxisch oder immunogen [43;178].

### ***Inhibitoren angiogenesstimulierender Faktoren***

Von der großen Zahl an Wachstumsfaktoren, die in den angiogenen Prozess involviert sind (s. Kap. 2.2, Tab. 1), werden VEGF und FGF-2 als die wichtigsten Mediatoren der Angiogenese erachtet. Es wurden zahlreiche Strategien entwickelt, um deren Produktion oder Freisetzung zu hemmen bzw. in deren Rezeptorwechselwirkungen einzugreifen. Die biologische Verfügbarkeit von FGF-2 und seine Wirkung auf Endothelzellen ist von der extrazellulären Heparin-Konzentration abhängig. Daher könnte die angiogene Aktivität von FGF-2 *in vivo* durch exogene Heparin-Analoga beeinflusst werden [83]. Zu diesen zählen u.a. Suramin [185], Pentosanpolysulfat [186] und carboxylierte Verbindungen [187]. Von diesen Verbindungen sind jedoch extrem hohe Dosen erforderlich und ihr Einsatz wird durch ihre antikoagulierende Eigenschaften limitiert [188]. Kim *et al.* gelang 1993 im Mausmodell die vollständige Verhütung des Neuroblastomwachstums durch neutralisierende anti-VEGF Antikörper [189]. Auf diesen anfänglichen Erfolg hin wurden verschiedene Antagonisten von VEGF und seiner Rezeptoren entwickelt und auf ihr tumorhemmendes Potential hin getestet. Dazu zählen Reagenzien gegen den *hypoxia inducible factor* (HIF), VEGF-Antisense-Oligonukleotide, VEGF-Ribozyme und lösliche VEGF-Rezeptoren. Auch die Expression dominant negativer Mutanten von VEGF-Rezeptoren in Endothelzellen, Antikörper gegen VEGF-Rezeptoren, und VEGF-DNA Vakzine wurden geprüft [190-192]. Die Mehrzahl der VEGF-Antagonisten ist im Tierversuch zu einer zufriedenstellenden Hemmung des Tumorwachstums in der Lage [193]. Daher wird die gegen VEGF gerichtete als die hoffnungsvollste antiangiogene Strategie bei der Behandlung maligner humaner Tumore erachtet. Über zehn verschiedene VEGF-hemmende Verbindungen befinden sich in unterschiedlichen Phasen der klinischen Prüfung. Darunter z.B. Avastatin, ein monoklonaler Antikörper, der allerdings in Phase III bei der Behandlung des metastatischen Mammakarzinoms versagte. Auch SU5416, ein VEGF-Rezeptor-Inhibitor, wurde im Februar 2002 aufgegeben [190]. Warum VEGF-Antagonisten in der humanen Prüfung nicht zu den zufriedenstellenden Ergebnissen führen, wie sie im Tierversuch beobachtet werden konnten, ist unklar. Ein möglicher Grund liegt darin, dass die Hemmung nur eines Zytokins vermutlich nicht ausreicht, um das Tumorwachstum vollständig zu kontrollieren. Die Tumorzellen gehen möglicherweise zur Produktion weitere angiogener Moleküle über. Diese Überlegung führte zur Entwicklung von SU6668, einer Substanz, welche die Rezeptortyrosinkinasen von VEGF, FGF-2 und PDGF hemmt [194].

### ***Synthetische Inhibitoren des endothelialen Zellwachstums***

TNP-470 (früher AGM-1470), ein synthetisches Derivat des antibiotisch wirkenden *Aspergillus fumigatus* Metaboliten Fumagillin, inhibiert Endothelzellproliferation und -migration *in vitro* [195;196]. Durch TNP-470 wird die Methionin-Aminopeptidase-Typ-2 (MetAP-2), die für die hydrolytische Spaltung von N-terminalen Methioninresten verantwortlich ist, gehemmt. Dies führt zur Inaktivierung bisher noch nicht identifizierter Proteine, die für die Progression des Zellzyklus von Endothelzellen essentiell sind [197]. Vermutlich handelt es sich um Proteine, die an der Signaltransduktionskaskade von VEGF beteiligt sind [198]. Nach erfolgreichem Einsatz im Tierversuch [199-202] befindet sich der Wirkstoff nun in verschiedenen Phasen der klinischen Prüfung bei soliden Tumoren und Lymphomen [203].

### ***Hemmstoffe der Gefäßinvasion***

Matrixmetalloproteinasen (MMPs) stellen eine Gruppe von mindestens elf Enzymen dar. Sie sind entscheidend an der tumorinduzierten Angiogenese und der Tumorzellmetastasierung beteiligt [204]. Durch die Hemmung der enzymatischen Aktivität der MMPs wird die Degradierung der Basalmembran sowie des umgebenden Bindegewebes verhindert, folglich wird sowohl den Endothelzellen als auch den Tumorzellen das Eindringen in die extrazelluläre Matrix (ECM) erschwert [205]. Nach Entdeckung der antiangiogenen Eigenschaften natürlicher *tissue inhibitors of metalloproteinases* (TIMPs) [206;207] – deren therapeutischer Einsatz jedoch durch ihre kurze Halbwertszeit limitiert wird [205] – konzentrierte sich die Forschung vor allem auf die Entwicklung synthetischer, oral verfügbarer Inhibitoren der Matrixmetalloproteinasen (MMPIs). Zu diesen zählt z.B. Marimastat, ein genereller Hemmstoff von MMPs (MMP-1,-2,-3,-7,-9) [208]. Er befindet sich wie BB-3644 und Metastat derzeit noch in der klinischen Prüfungsphase [209-211]. Weitere Substanzen mit inhibitorischer Wirkung auf MMPs sind Bryostatine (natürlich vorkommende makrozyklische Laktone) [205], Minocyclin [212] und das Tetrazyklin-Derivat COL-3 [213].

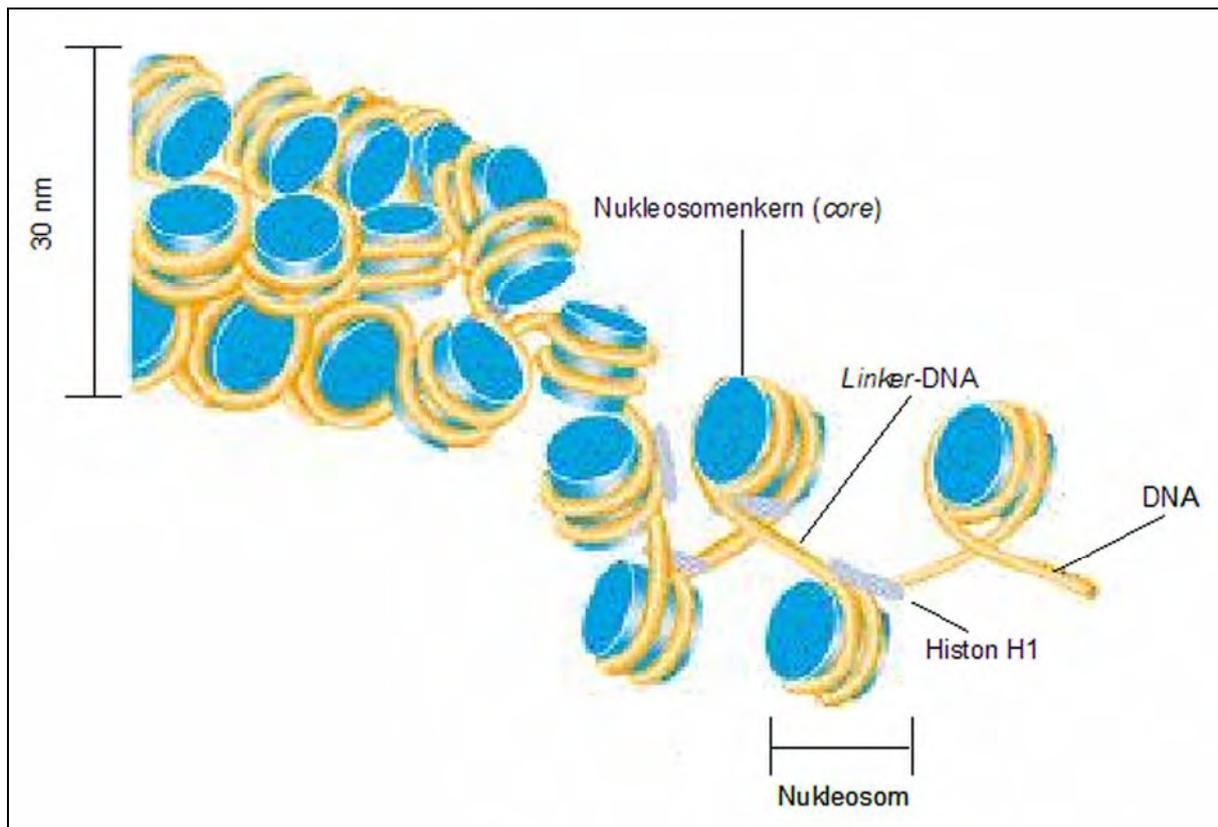
## 1.3 Histondeacetylasen

### 1.3.1 Einführung

Die sich wiederholende morphologische Grundeinheit des Chromatins ist das Nukleosom. Dieses setzt sich zusammen aus dem Nukleosomenkern (*core*) – bestehend aus je zwei der Histoneproteine H2a, H2b, H3 und H4 und ca. 146bp DNA, die in etwa  $1\frac{3}{4}$  Windungen um das Oktamer gewickelt sind – sowie der *linker*-DNA, welche benachbarte Nukleosomen miteinander verbindet. Von außen lagert sich zusätzlich das strukturvermittelnde Histon H1 an die DNA [214-216] (s. **Abb. 1.9**). Zwischen den Histonen mit einem hohen Anteil an positiv geladenen Aminosäuren und der negativ geladenen DNA besteht eine starke elektrostatische Wechselwirkung. Diese kann über die N-terminalen Enden der *core*-Histone beeinflusst werden [217;218]. Die überwiegend Lysin- und Arginin-reichen *histone-tails* bilden den Ansatzpunkt für Modifizierungsreaktionen wie Acetylierung, Deacetylierung, Phosphorylierung, Methylierung und Ubiquitinierung [219;220]. Derartige posttranslationale Modifikationen spielen in der Regulation der Genexpression eine wichtige Rolle. Die reversible Acetylierung der *Core*-Histone (s. **Abb. 1.10**) gilt diesbezüglich als eine der bedeutendsten Reaktionen [221;222]:

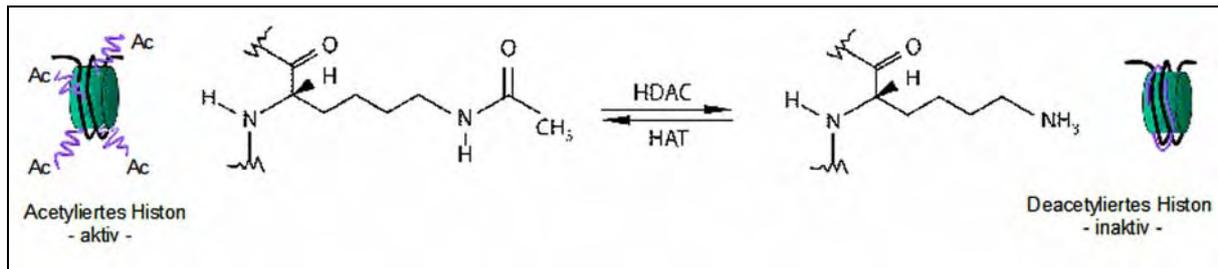
*Histonacetyltransferasen* (HATs) übertragen Acetylgruppen auf die Lysinreste der *Core*-Histone. Dadurch wird deren positive Ladung kompensiert. Es folgt eine Auflösung der Nukleosomenstruktur und die Entspiralisierung des Chromatins zum sog. Euchromatin. Die DNA liegt nun histonfrei vor und wird so leichter zugänglich für Transkriptionsfaktoren [217;218;223].

*Histondeacetylasen* (HDACs) katalysieren die Deacetylierung der Histoneproteine durch hydrolytische Entfernung der Acetylgruppen und legen so die positive Ladung wieder frei. Die Einbindung der DNA in Nukleosome, d.h. die Kondensierung des Chromatins zum sog. Heterochromatin, geht mit einer Repression der Transkription einher [218;224;225].



**Abbildung 1.9 Die Nucleosomenstruktur** (nach Griffith *et al.*, 1996 [226]; DNA, Desoxyribonukleinsäure).

Die Aktivität von Histondeacetylasen wurde 1964 erstmals beschrieben [227]. Erst Mitte der 90er Jahre wurden humane HDACs identifiziert und isoliert [228;229]. Humane Histondeacetylasen werden – entsprechend ihrer Homologie zu Proteinvorfahren in der Hefe (yeast, y) – in drei Substanzklassen eingeteilt: HDAC1-3 und HDAC8 bilden die Gruppe der yRPD3-ähnlichen HDAC, zusammengefasst in der Klasse I HDAC [229-232]. Klasse II HDAC sind Homologe der yHDA1-Deacetylase (HDAC4-7, HDAC9-10) [231;233-236]. Klasse III HDAC leiten sich vom ySIR2-Protein ab und beinhalten die Enzyme SIRT1-7 [237]. Gregoretto *et al.* ernannten eine neue Klasse IV für die erst kürzlich charakterisierte HDAC11 [238], da sie keiner der bestehenden Klassen eindeutig zugeordnet werden kann [239].



**Abbildung 1.10** Reversible Histonacetylierung (modifiziert nach Hendrich und Bickmore, 2001 [240]; HAT, Histonacetyltransferase; HDAC, Histondeacetylase)

### 1.3.2 Pathogenetische Bedeutung von HDACs bei malignen Erkrankungen

In gesunden Zellen besteht eine ausgeglichene Dynamik zwischen den Aktivitäten von Histonacetyltransferasen und Histondeacetylase. Dies führt zu einem zellspezifischen Genexpressionsmuster, das für ein normales Wachstumsverhalten der Zellen essentiell zu sein scheint [241]. Störungen dieses Acetylierungs-/Deacetylierungsgleichgewichtes resultieren in Änderungen der transkriptionellen Aktivität. Eine Folge kann z.B. die verminderte Expression von Tumorsuppressorgenen sein [242]. Dies gilt ebenso für Gene, die an der Induktion von Apoptose, an der Zellzykluskontrolle und Differenzierungsinduktion beteiligt sind [243]. Wiederholt ließ sich ein Zusammenhang zwischen fehlregulierter Histonacetylierung und Krebserkrankungen zeigen: so gehen z.B. akute Promyelozyten-leukämien [244;245] sowie Tumore des Digestionstraktes – darunter auch kolorektale Karzinome – mit aberranter Rekrutierung der HDACs einher [246-248]. **Tabelle 1.2** zeigt eine Übersicht Histondeacetylase-regulierter Gene mit pathogenetischer Relevanz.

### 1.3.3 Bedeutung von HDACs für die Tumorangiogenese

Durch die Induktion der tumorinduzierten Angiogenese leisten HDACs einen weiteren, nicht unerheblichen Beitrag zur Tumorprogression [242;249]. Hypoxie – wie sie in nekrotischen Arealen maligner Tumore vorherrscht – potenziert die Expression des Transkriptionsfaktors HIF-1 $\alpha$ . Von diesem werden wiederum angiogenesestimulierende Faktoren wie VEGF kontrolliert [255].

**Tabelle 1.2** Von Histondeacetylasen regulierte, pathogenetisch relevante Gene ([242;250-254]; HDACs, Histondeacetylasen; HIF-1 $\alpha$ , hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ ; TGF- $\beta$ , transforming growth factor- $\beta$ ; VEGF, vascular endothelial growth factor; vHL, von Hippel-Lindau).

| Durch HDACs regulierte Gene (Auswahl) |   |
|---------------------------------------|---|
| Expression ↓                          |   |
| - Zellzyklusinhibitor-Gene            | p21 <sup>WAF1</sup> , p27 <sup>Kip1</sup> |
| - Tumorsuppressorgene                 | vHL, p53                                  |
| - Differenzierungsgene                | TGF- $\beta$                              |
| - proapoptotische Gene                | bad, bak                                  |
| Expression ↑                          |   |
| - Zellzyklusgene                      | Cyclin A, Cyclin D1                       |
| - antiapoptotische Gene               | bcl-2, bcl-xL                             |
| - Angiogenesefaktoren                 | HIF-1 $\alpha$ , VEGF                     |

Die Induktion der Angiogenese infolge Hypoxie gilt als eine Voraussetzung für das progressive Wachstum und die Metastasierung solider Tumore. Darüber hinaus wird auch die Induktion von Histondeacetylasen durch die geringe Sauerstoffspannung neoplastischen Gewebes verstärkt. Dies konnten Kim *et al.* für HDAC1 nachweisen. Die Arbeitsgruppe stellte ferner fest, dass die übermäßige Expression von HDAC1 zu einer Expressionshemmung der Tumorsuppressorgene p53 und vHL führt. Die Expression von HIF-1 $\alpha$  sowie VEGF wurde dagegen induziert. Weiter wurde gezeigt, dass HDAC1 die *in vitro* Angiogenese humaner Endothelzellen stimuliert: mit HDAC1 transfizierte Zellen produzierten ein Medium, welches die Formierung kapillärer Netzwerke induzierte. Der Arbeitsgruppe gelang es zu dokumentieren, dass diese durch HDAC1 stimulierte Ausbildung tubulärer Strukturen (*tube formation*) vermutlich durch VEGF vermittelt wird. Desweiteren war auch die endotheliale Proliferation, Migration und Lebensdauer unter Behandlung mit dem genannten konditionierten Medium signifikant gesteigert. Zusätzlich konnten Kim *et al.* im Tierversuch nachweisen, dass Hypoxie auch *in vivo* zu verstärkter Expression sowohl von HDAC1 als auch HIF-1 $\alpha$  und VEGF führt. Die Arbeitsgruppe schloss aus ihren Ergebnissen, dass HDACs in der Angiogeneseinduktion eine signifikante Bedeutung zukommt – und ihre Hemmung einen vielversprechenden Ansatz in der Inhibition der Tumorangiogenese darstellt [242].

### 1.3.4 Hemmung von Histondeacetylasen

Als Hemmstoffe der Histondeacetylasen wirken sowohl natürlich vorkommende als auch synthetisch erzeugte Substanzen. Eine Übersicht über die verschiedenen Gruppen von HDAC-Inhibitoren zeigt **Tabelle 1.3**.

HDAC-Inhibitoren führen – sowohl *in vitro* als auch *in vivo* – zu einer Akkumulation acetylierter Histone [256]. Dies resultiert gewöhnlich in einer Unterbrechung der transkriptionellen Repression bestimmter Gene [257;258]. Es werden vor allem Gene, die an Differenzierungsvorgängen und an der Proliferationskontrolle (z.B. p21<sup>WAF1</sup>, p27<sup>Kip1</sup>) beteiligt sind, verstärkt transkribiert [251;259]. Zu den Folgen zählen z.B. die Hemmung der Zellzyklusprogression und die Induktion der terminalen Differenzierung von Tumorzellen *in vitro* [260-262]. Zusätzlich können HDAC-Inhibitoren zu einer Apoptoseinduktion führen, indem sie die Expression antiapoptotisch wirkender Gene wie bcl-2 und bcl-xL reduzieren [254;263].

Die tumorhemmenden Eigenschaften von HDAC-Inhibitoren konnten *in vivo* eindrucksvoll bestätigt werden. Beispielsweise wurde im Nacktmausmodell durch die Behandlung mit den HDAC-Inhibitoren SAHA und Pyroxamid eine jeweils signifikante Wachstumshemmung subkutan transplanteder Prostatatumore erzielt [260;264]. Auch in weiteren Tierversuchen führte die Gabe von verschiedenen HDAC-inhibierenden Substanzen zu einer Verminderung der Tumorausbreitung, die überdies assoziiert war mit einer verlängerten Überlebenszeit der behandelten Tiere im Vergleich zur Kontrollgruppe [256]. Von Sasakawa *et al.* wurde postuliert, dass derartige Resultate auf die Induktion von Apoptose, Unterbrechung des Zellzyklus und Differenzierungsinduktion – vermittelt über eine Modulation der Genexpression infolge einer Hyperacetylierung von Histonen – zurückzuführen sind [265].

Gegenstand aktueller Forschung ist auch das antiangiogene Potential von Hemmstoffen der Histondeacetylasen. Erst kürzlich wurde entdeckt, dass HDAC-Inhibitoren hemmend auf die tumorinduzierte Angiogenese wirken können. Dies wurde zuerst für FK228 nachgewiesen. Die Substanz blockierte die durch Hypoxie stimulierte Proliferation, Invasion, Migration, Adhäsion sowie *tube formation* kultivierter boviner Endothelzellen. Auch *in vivo* bewirkte FK228 eine Hemmung der Neovaskularisation [266]. Sowohl die Expression von HIF-1 $\alpha$  als auch die VEGF-Expression wurde durch die Substanz reduziert [267].

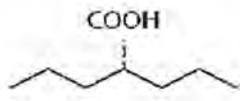
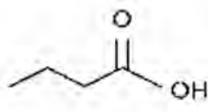
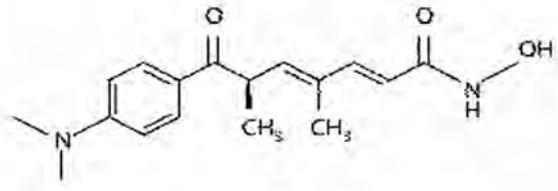
**Tabelle 1.3**                      **Verschiedene Gruppen von Histondeacetylase-Inhibitoren**  
(Übersichten bei [243;268;269])

| <b>Histondeacetylase - Inhibitoren</b>  |  |  |   |
|---|--|--|---|
| <b>Kurzkettige Fettsäuren</b>   | <b>Hydroxaminsäuren</b>                            | <b>Zyklische Tetrapeptide mit Epoxyketonstruktur</b> | <b>Zyklische Tetrapeptide ohne Epoxyketonstruktur</b> |
| Butyrat   | m-carboxyannamic acid<br>bishydroxamic acid (CBHA) | Chlamydocin  | Apicidin  |
| Phenylbutyrat   | Oxamflatin   | Cyl-1, Cyl-2   | Cyclic hydroxamic acid containing peptide (CHAP)      |
| Valproinsäure   | Pyroxamide   | Diheteropeptin                                       | FK-228 (=FR901228 =Depsipeptid)                       |
|   | Scriptaid  | HC-Toxin   |   |
|   | Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA)             | Trapoxin   |   |
|   | Trichostatin A (TSA)                               | WF-3161  |   |
| Weitere HDAC-Inhibitoren sind Depudecin (ein natürliches Epoxid) und die Benzamide CI-994, MS-275 (MS-27-275) |  |  |   |

Es existieren einzelne Daten über weitere HDAC-Hemmstoffe, welche indirekt – über Modulation angiogener Faktoren – oder unmittelbar angiogene Prozesse beeinflussen. Dazu zählen SAHA, Valproat, Butyrat und Trichostatin A [270-272]. Die drei letztgenannten werden in den folgenden Abschnitten näher charakterisiert.

### 1.3.4.1 Der Histondeacetylase-Inhibitor Valproat

Valproinsäure (Valproat, VPA; Dipropyllessigsäure) ist eine verzweigt-kettige Carbonsäure mit 5 Kohlenstoffatomen in der Haupt- und 3 Kohlenstoffatomen in der Seitenkette (s. Abb. 1.11). VPA wurde 1882 erstmals von Burton synthetisiert [273], bis zu den ersten therapeutischen Anwendungen vergingen allerdings fast 80 Jahre. Ursprünglich wurde die Substanz zur Herstellung eines Bismutsalzes verwendet, später wurde sie als lipophiles Vehikel zur Lösung wasserunlöslicher, krampf-lösender Khellin-Derivate eingesetzt. Dabei wurde entdeckt, dass die Valproinsäure selbst antikonvulsive Eigenschaften besitzt. Klinische Studien bestätigten ihre Wirksamkeit bei Patienten mit Krampfleiden [274;275]. Inzwischen hat sich die Valproinsäure in der Langzeitbehandlung fokaler und generalisierter Epilepsien etabliert [276]. Daneben wird VPA zunehmend zur Therapie weiterer Hirnerkrankungen sowie psychischer Leiden und zur Migräneprophylaxe herangezogen [277]. VPA besitzt teratogenes Potential: wird das Medikament in der frühen Schwangerschaft eingesetzt, kann es zu embryonalen Missbildungen wie Spina bifida führen [278]. Phiel *et al.* und Göttlicher *et al.* gingen fast zeitgleich auf die Suche nach dem Mechanismus dieser Nebenwirkung. Beide Arbeitsgruppen stellten fest, dass Valproinsäure in einen grundlegenden Prozess der Steuerung der Genaktivität eingreift. Sie konnten VPA als einen potenten Hemmstoff von Histondeacetylasen identifizieren. Die Substanz bewirkte eine Hyperacetylierung der Histone H3 und H4 in Zellkulturen sowie *in vivo*. Die Studien zeigten weiter, dass VPA in therapeutischer Dosierung die HDAC-abhängige Repression verschiedener Transkriptionsfaktoren unterbricht und so zu einer Verstärkung der Genaktivität führt. Beide Arbeitsgruppen postulierten eine Korrelation zwischen der HDAC-hemmenden Wirkung der Valproinsäure und ihrer Teratogenität [279;280]. Zu ihren antikonvulsiven Eigenschaften scheint diesbezüglich kein Zusammenhang zu bestehen [279;281]. Nach Strukturanalysen wurde von Göttlicher *et al.* erstmals vermutet, dass VPA die Aktivität von Histondeacetylasen *in vitro* durch Bindung an das katalytische Zentrum des Enzyms hemmen kann. Dieselbe Arbeitsgruppe prüfte das tumorhemmende Potential der Valproinsäure *in vitro* und *in vivo*. Unter Verwendung verschiedener Karzinom-Zelllinien (F9 Teratokarzinomzellen, MT-450 Mammakarzinomzellen) wurde demonstriert, dass VPA die Induktion von Zelldifferenzierung und Apoptose bewirkt. Desweiteren wurde bei HT-29 Kolonkarzinomzellen eine Hemmung der Zellproliferation durch VPA beobachtet. Im Tierversuch (MT-450 Rattenmodell) führte eine Behandlung mit VPA zu einer wesentlichen Verminderung von primärem Tumorwachstum sowie zu reduzierter Metastasenbildung.

|                |  |
|----------------|--|
| Valproat       |  |
| Butyrat        |  |
| Trichostatin A |  |

**Abbildung 1.11** Strukturformeln von Valproat, Butyrat und Trichostatin A

Es wurde postuliert, dass die beobachteten antineoplastischen Effekte – zumindest teilweise – auf die Funktion von VPA als HDAC-Inhibitor zurückzuführen sind [279]. Auch weitere Studien beschäftigten sich mit der Wirkung der Valproinsäure auf die Tumorprogression. Bei kultivierten Neuroblastomzellen induzierte VPA eine Proliferationshemmung sowie morphologische Veränderungen unter Ausbildung von Differenzierungsmerkmalen. Zusätzlich reduzierte die Substanz das Metastasierungsvermögen der behandelten Zellen durch verstärkte Expression von Zelladhäsionsmolekülen [282;283]. Bei Nacktmäusen mit subkutanen Neuroblastomen resultierte die Behandlung mit VPA in einer Abnahme des Tumolvolumens. Dies wurde auf die durch Valproat induzierte Differenzierung und Apoptose zurückgeführt [284]. Nachweislich wurde proapoptisches bcl-2 durch VPA verstärkt exprimiert. Inzwischen wird bezüglich der Differenzierungsinduktion bei Neuroblastomzellen ein Zusammenhang mit der HDAC-hemmenden Aktivität der Valproinsäure vermutet [285]. Die Wirksamkeit von Valproat bei pädiatrischen malignen Gliomen wird bereits in einer aktuellen klinischen Studie untersucht [286].

#### 1.3.4.2 Der Histondeacetylase-Inhibitor Butyrat

Butyrat ist eine aliphatische C4-Fettsäure (s. **Abb. 1.12**), die natürlicherweise durch anaerobe bakterielle Fermentation nicht resorbierter Kohlenhydrate im Digestionstrakt von Säugetieren gebildet wird. Als Hauptenergielieferant der Kolonozyten stimuliert Butyrat deren physiologische Proliferation *in vivo* [287;288]. Bei normaler Darmmucosa besteht zwischen Wachstum und Differenzierung des Kolonepithels einerseits und Zelluntergang durch Apoptose andererseits ein Fließgleichgewicht. Eine zugunsten der Zellproliferation verschobene Bilanz wird als entscheidender Faktor in der Kolonkarzinogenese angesehen [289].

Butyrat greift über verschiedene Wege regulierend in gestörte zelluläre Wachstumsprozesse ein. Zum einen bewirkt die Fettsäure eine deutliche Wachstumshemmung kultivierter Kolonkarzinomzellen (z.B. HT-29, LIM1215, Colo-320, SW-948) [250;290;291]. Dabei erwies sich Butyrat verglichen mit anderen natürlich vorkommenden kurzkettigen Fettsäuren (Propionat, Valerat, Acetat) als potentester Inhibitor der Zellproliferation [290]. Von Gaschott *et al.* wurde am Caco-2 Modell demonstriert, dass die Expression des Zellzyklusinhibitor-Gens p21<sup>WAF1</sup> unter Butyratbehandlung selektiv gesteigert, die Expression von Cyclin A und cdk 6 reduziert wird. Dies war nachweislich auf die Butyrat-induzierte Expressionssteigerung des Vitamin D Rezeptors (VDR) zurückzuführen [292;293]. Desweiteren wird die Apoptose-Resistenz, welche neoplastische Kolonozyten während der Tumorgenese entwickeln, durch Butyrat aufgehoben. Eine meist signifikante Induktion der Apoptose wurde z.B. bei den Kolonadenom- und Kolonkarzinom-Zelllinien HCT-116, HT-29, Caco-2, SW620 und VACO5 beobachtet [294-298]. Häufig ist mit der beschriebenen gesteigerten Zellproliferation von Karzinomzellen auch eine Unfähigkeit zur Differenzierung verbunden. Daher zielen Therapieansätze nicht nur auf eine Hemmung der Proliferation, sondern auch auf eine Induktion der Differenzierung. Wie an verschiedenen humanen Kolon- bzw. Rektumkarzinom-Zelllinien (Caco-2, HT-29, LIM1215, HRT-18) nachgewiesen werden konnte, steigt unter Butyratbehandlung die Aktivität von Differenzierungsmarkern (z.B. alkalische Phosphatase, Gammaglutamyltranspeptidase) signifikant an [291;293;299-302]. In einer aktuellen Studie konnten Gaschott und Stein zeigen, dass die durch Butyrat vermittelte Expressionssteigerung des Vitamin D Rezeptors (VDR) an der Butyrat-induzierten Differenzierung von Caco-2 Zellen beteiligt ist. Durch kombinierte Behandlung mit Butyrat und 1,25-Dihydroxyvitamin D3 (1,25-(OH)<sub>2</sub>D3) wurde die – schon durch Butyrat alleine gesteigerte – Aktivität der alkalischen Phosphatase synergistisch weiter verstärkt. Der Zusatz

eines VDR Antagonisten hob den Effekt auf [293]. Daniel *et al.* fanden weiter, dass der p38 *mitogen-activated protein kinase* (MAPK) Signalweg am differenzierungsfördernden Effekt von Butyrat über die Steigerung der VDR Expression beteiligt ist [303]. Folge der Butyrat-induzierten Differenzierung soll die Wiederherstellung des normalen Phänotyps und der ursprünglichen Funktion der Kolonepithelzellen sein [304;305]. Augeron *et al.* konnten entsprechende morphologische und funktionelle Änderungen von Kolonkarzinomzellen einhergehend mit ihrer terminalen Differenzierung dokumentieren [306]. Darüber hinaus wurde – sowohl *in vitro* als auch in einem *in vivo* Modell – eine Korrelation zwischen Butyrat-induzierter Differenzierung und der Wachstumshemmung kolorektaler Karzinomzellen ermittelt [300;301]. Nach einer Untersuchung von Schröder *et al.* spielt die TGF- $\beta$  Isoform TGF- $\beta$ 1 in diesem Zusammenhang eine entscheidende Rolle [301]. Die protektiven Effekte von Butyrat gegenüber der kolorektalen Karzinombildung wurden in weiteren *in vivo* Studien evaluiert. In einem experimentellen Tiermodell wurde durch direkt ins Darmlumen (Caecum) der Versuchstiere instilliertes Butyrat die Tumorausbeute sowie die Inzidenz maligner Entartungen des Kolons signifikant reduziert [307]. Mit Hilfe eines anderen Tierversuches wurde bei Ratten mit Dickdarntumoren die Relevanz der fermentativen Produktion von Butyrat bestimmt. Dabei korrelierte eine fütterungsbedingte Steigerung der Butyratkonzentration im Kolon signifikant mit verringertem Tumorkommen sowie verminderter Tumormasse [308].

Ein gemeinsamer Mechanismus der kurzkettigen Fettsäuren Valproat und Butyrat, welcher zu deren antineoplastischen Effekten beiträgt, ist ihre Fähigkeit, den Acetylierungsgrad von Histonen zu modifizieren [304;309]. Butyrat wurde bereits vor fast 30 Jahren als Inhibitor von Histondeacetylasen identifiziert [310], über die exakten Mechanismen der Butyrat-induzierten HDAC-Hemmung liegen allerdings auch bis heute kaum gesicherte Daten vor. Bekannt ist, dass sie in einer relativen Hyperacetylierung der Histone H3 und H4 resultiert [310;311]. Dies führt zu einer Änderung der Expression verschiedener Gene, z.B. zur Stimulation der p21<sup>WAF1</sup> Expression und zur Reduktion der Cyclin B1 Expression [296;312]. Es finden sich zunehmend Studien, die den Zusammenhang zwischen Butyrat-vermittelter Histonmodifizierung und der Progression kolorektaler Tumore thematisieren. So demonstrierten Wu *et al.* in einer *in vitro* Versuchsreihe mit der Kolonkarzinom-Zelllinie HT-29, dass eine durch Butyrat bedingte Histonhyperacetylierung unmittelbar mit zellulärem Wachstumsstillstand, Differenzierungs- und Apoptoseinduktion korreliert [302].

### 1.3.4.3 Der Histondeacetylase-Inhibitor Trichostatin A

Trichostatin A (TSA) ist eine Hydroxaminsäure (4,6-Dimethyl-7-[*p*-dimethylaminophenyl]-7-oxahepta-2,4-dienohydroxamix acid; s. **Abb. 1.13**), die ursprünglich als fungistatische Substanz aus *Streptomyces hygroscopicus* isoliert wurde [313]. Nachfolgend wurde erkannt, dass TSA eine sehr starke HDAC-hemmende Aktivität aufweist [314]. Trichostatin zählt neben Trapoxin B zu den ersten bekannten Naturstoffen mit HDAC-inhibierender Wirkung [314;315]. TSA gilt als einer der potentesten Hemmstoffe von HDAC der Klasse I und II. Schon in nanomolaren Konzentrationen induziert TSA spezifisch und reversibel eine Hyperacetylierung von Histonen. Dies konnte sowohl *in vitro* als auch *in vivo* gezeigt werden [314;316;317]. Aufgrund seiner beachtlichen Potenz dient TSA auch häufig als Vergleichssubstanz bei der Suche nach weiteren Stoffen mit HDAC-hemmender Wirkung bzw. als Grundlage für die Entwicklung synthetischer, einfach strukturierter analoger Substanzen [261;318]. Das natürliche Produkt TSA, welches heute überwiegend aus *Streptomyces platensis* gewonnen wird, induziert Austritt aus dem Zellzyklus, Zelltod sowie Zelldifferenzierung in zahlreichen neoplastischen Zellarten [262]. Park *et al.* untersuchten beispielsweise die *in vitro* Effekte von TSA auf verschiedene Nierenzellkarzinom-Zelllinien (u.a. ACHN, A498, Caki-1). TSA hemmte signifikant die Proliferation aller getesteten Zelllinien, abhängig vom Zelltyp wurde ein G1 oder G2-M Zellzyklusstopp induziert. Desweiteren wurden die Proteinwerte von Cyclin A und Cyclin D1 unter TSA-Behandlung vermindert, p27<sup>Kip1</sup> wurde verstärkt produziert. Auch eine Zunahme der Apoptose wurde beobachtet, begleitet von verringerter Bcl-2 Bildung [251]. Bei Gliom- und Neuroblastomzellen war neben p27<sup>Kip1</sup> zusätzlich die Expression von p21<sup>WAF1</sup> erhöht [319], ebenso das proapoptotische bad Protein [253]. Die antiproliferativen Effekte wie auch die signifikante proapoptotische Potenz von TSA konnten ferner bei Zervixkarzinom- [320], Myelom- [321] und hepatischen Karzinomzellen [322] nachgewiesen werden. Auch bei den Kolonadenokarzinom-Zelllinien VACO5 und HCT116 zeigte sich eine ausgeprägte Apoptoseverstärkung und Wachstumshemmung durch TSA [298]. Vigushin *et al.* prüften die antineoplastischen Effekte von TSA *in vitro* und *in vivo*. Bei allen acht untersuchten Mammakarzinom-Zelllinien war eine Hemmung der Zellproliferation zu beobachten. Begleitend wurde eine Hyperacetylierung des Histons H4 ermittelt. Die histologisch klassifizierten Tumore der TSA-behandelten Versuchstiere bestanden zum Großteil aus Adenomen – die der Kontrolltiere waren dagegen überwiegend Adenokarzinome. Als mögliche Erklärung für die Ausbildung des benignen Phänotyps wurde postuliert, dass TSA

eine Induktion der Zelldifferenzierung vermittelt [323]. Von Wittich *et al.* wurden durch *in vivo* Versuche mit Friend Leukämiezellen neben einer Proliferationshemmung die Induktion terminaler Differenzierung durch verschiedene HDAC-Hemmstoffe nachgewiesen. Diesbezüglich zählte TSA zu den Substanzen mit den stärksten Effekten [324]. Durch weitere Versuche mit dieser Zellart wurde belegt, dass ausschließlich Substanzen mit HDAC-hemmender Aktivität die terminale Zelldifferenzierung induzieren. Als hyperacetyliertes Histon wurde erneut H4 ermittelt [261]. In diesem Zusammenhang ist interessant, dass die Potenz von TSA bezüglich der Differenzierungsinduktion bekannt war, bevor TSA als HDAC-Hemmstoff identifiziert wurde [325]. Inzwischen geht man davon aus, dass die Modifizierung der Histonacetylierung die Basis für alle Effekte von TSA darstellt. Zusätzliche Zielproteine neben der Histondeacetylase können zwar nicht gänzlich ausgeschlossen werden, gelten aber als unwahrscheinlich [317]. Dies wurde daraus abgeleitet, dass Tumorzellen mit mutierter Histondeacetylase gegenüber dem tumorhemmenden Einfluss von TSA resistent sind [314;326].

## **1.4 Ziel der Arbeit**

Ziel der vorliegenden Arbeit war es, verschiedene HDAC-Inhibitoren als Hemmstoffe der tumorinduzierten Angiogenese zu ermitteln und ihre Wirksamkeit vergleichend zu betrachten. Als Testsubstanzen wurden Valproat, Butyrat und Trichostatin A eingesetzt. Zunächst sollte die Wirkung dieser HDAC-Inhibitoren auf kultivierte Endothelzellen untersucht werden. Im Anschluss daran sollte ihr Einfluss auf die Produktion proangiogener Faktoren durch Kolonkarzinomzellen aufgezeigt werden. Schließlich galt es zu untersuchen, welche Regulationsmechanismen den gezeigten Effekten möglicherweise zugrundeliegen.

Der häufigste maligne Dickdarmtumor ist mit 95% das Adenokarzinom [4]. Daher wurde für die Untersuchungen die Zellkulturlinie Caco-2 gewählt. Die Versuche mit Endothelzellen wurden mit *human umbilical vein endothelial cells* (HUVECs) durchgeführt.

## 2 MATERIAL UND METHODEN

### 2.1 Chemikalien und Lösungen

#### 2.1.1 Allgemeine Chemikalien und Lösungen

|   |                           |
|---|---------------------------|
| ATP                                       | Merck, Darmstadt          |
| Acrylamid/Bisacrylamid (37,5:1)           | Applichem, Darmstadt      |
| Agarose                                   | Gibco, Eggenstein         |
| Ameisensäure, ca. 98%ig                   | Aldrich-Chemie, Steinheim |
| Aminosäuren, nicht-essentiell             | Gibco, Eggenstein         |
| Ammoniumperoxodisulfat (APS)              | Merck, Darmstadt          |
| Aqua ad injectabilia                      | Braun, Melsungen          |
| Aqua bidestillata                         | Braun, Melsungen          |
| BioRad-Reagenz                            | BioRad, München           |
| Borsäure, H <sub>3</sub> BO <sub>3</sub>  | Roth, Karlsruhe           |
| Bromphenolblau                            | Sigma, Deisenhofen        |
| Xylen Cyanol                              | Roth, Karlsruhe           |
| Glyzerol                                  | Merck, Darmstadt          |
| Buttersäure, Natriumsalz                  | Merck, Darmstadt          |
| Chlorophorm                               | Merck, Darmstadt          |
| Dimethylsulfoxid (DMSO)                   | Merck, Darmstadt          |
| DNA Ladder, 100 bp                        | Invitrogen, Karlsruhe     |
| dNTP Master Mix (5 mM Lösungen)           | Eurogentec, Seraing, B    |
| Dodecylsulfat, Natriumsalz (SDS)          | ICN Biomedicals, Eschwege |
| DTT 0,1mM                                 | Invitrogen, Karlsruhe     |
| Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium (DMEM) | Gibco, Eggenstein         |

|   |                         |
|---|-------------------------|
| EDTA                                      | Sigma, Deisenhofen      |
| Essigsäure                                | AppliChem, Darmstadt    |
| Ethanol                                   | Roth, Karlsruhe         |
| Ethidiumbromid (Etbr.)                    | Roth, Karlsruhe         |
| Formaldehyd                               | Merck, Darmstadt        |
| Gentamicin                                | Biochrom, Berlin        |
| Glycin                                    | Merck, Darmstadt        |
| HCl                                       | Merck, Darmstadt        |
| Heparin Sodium                            | Sigma, Deisenhofen      |
| HEPES                                     | Sigma, Deisenhofen      |
| Human FGF-acidic                          | Cell Concepts, Umkirch  |
| Isopropanol                               | Merck, Darmstadt        |
| Kälberserum, foetal (FCS)                 | Gibco, Eggenstein       |
| Kristallviolett                           | Sigma, Deisenhofen      |
| M 199 with Earle`s Salt                   | Gibco, Eggenstein       |
| Magnesiumchlorid, MgCl <sub>2</sub>       | Roth, Karlsruhe         |
| Magnesiumchlorid, MgCl <sub>2</sub> 50 mM | Invitrogen, Karlsruhe   |
| Methanol                                  | Riedel-deHaen, Hannover |
| Magermilchpulver                          | Töpfer, Dietmannsried   |
| Mineralöl                                 | Sigma, Deisenhofen      |
| NaCl                                      | Merck, Darmstadt        |
| NaOH                                      | Riedel-deHaen, Hannover |
| PBS-Lösung                                | Gibco, Eggenstein       |
| DNA-Ladder                                | Gibco, Eggenstein       |
| PCR-Reaktionspuffer                       | Invitrogen, Karlsruhe   |
| Penicillin-Streptomycin                   | Biochrom, Berlin        |

|  |   |
|--|---|
| Ponceau-S-Lösung   | Sigma, Deisenhofen                      |
| Probenpuffer Roti <sup>®</sup> -Load 1, nicht reduzierend        | Roth, Karlsruhe                         |
| Proteaseinhibitor-Cocktail (Tabletten)                           | Boehringer, Mannheim                    |
| Precision Plus Protein <sup>™</sup> Standards, Dual Color        | BioRad, München                         |
| Pyruvat, Natriumsalz   | Gibco, Eggenstein                       |
| RNAbee <sup>®</sup>  | Wak Chemie, Bad Homburg                 |
| RT-Puffer (First Strand)   | Invitrogen, Karlsruhe                   |
| SuperScript <sup>™</sup> II H <sup>-</sup> Reverse Transkriptase | Invitrogen, Karlsruhe                   |
| SuperSignal <sup>®</sup> Enhancer Solution                       | Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA |
| SuperSignal <sup>®</sup> Peroxide Solution                       | Pierce Biotechnology, Rockford, IL, USA |
| <i>Taq</i> -DNA-Polymerase (5 U/μl)                              | Invitrogen, Karlsruhe                   |
| TEMED  | Sigma, Deisenhofen                      |
| Trichostatin A   | Sigma, Deisenhofen                      |
| Tris-Base  | Amersham, Buckinghamshire, UK           |
| Trypanblau   | Sigma, Deisenhofen                      |
| Trypsin-EDTA-Lösung  | Biochrom, Berlin                        |
| Tween 20   | Sigma, Deisenhofen                      |
| Valproat   | Merck, Darmstadt                        |

### 2.1.2 Primer

|                           |                       |
|---------------------------|-----------------------|
| GAP-286, 100 pmol/μl      | Invitrogen, Karlsruhe |
| GAP-788, 100 pmol/μl      | Invitrogen, Karlsruhe |
| GAP-IST, 100 pmol/μl      | Invitrogen, Karlsruhe |
| VEGF-A (67), 100 pmol/μl  | Invitrogen, Karlsruhe |
| VEGF-B (289), 100 pmol/μl | Invitrogen, Karlsruhe |
| VEGF-CB IST, 100 pmol/μl  | Invitrogen, Karlsruhe |

### 2.1.3 Antikörper

#### 2.1.3.1 Erstantikörper

|                  |                                      |
|------------------|--------------------------------------|
| Akt2 (F7)        | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg |
| β-Actin          | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg |
| FGF-2            | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg |
| HIF-1α           | BD Biosciences, Heidelberg           |
| p-Akt 1/2/3      | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg |
| PI 3-kinase p85α | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg |
| VEGF (Ab-3)      | Oncogene, Darmstadt                  |

#### 2.1.3.2 Zweitantikörper

|                 |                                       |
|-----------------|---------------------------------------|
| anti-mouse IgG  | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg  |
| anti-rabbit IgG | Vector Laboratories, Peterborough, UK |
| anti-goat IgG   | Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg  |

#### 2.1.4 Kit-Systeme

|   |                                  |
|---|----------------------------------|
| CytElisa™ Human VEGF                          | CytImmune, Umkirch               |
| Cell Proliferation ELISA, BrdU (colorimetric) | Roche Diagnostics, Mannheim      |
| <i>In Vitro</i> Angiogenesis Assay Kit        | Chemicon, Temecula, CA, USA      |
| Nuclear Extract Kit                           | Active Motif, Rixensart, Belgium |
| TransAM™ HIF-1 Transcription Factor Assay     | Active Motif, Rixensart, Belgium |
| Cell Invasion Assay Kit                       | Chemicon, Temecula, CA, USA      |
| 20S Proteasome Activity Assay Kit             | Chemicon, Temecula, CA, USA      |

## 2.2 Arbeitsmaterialien und Geräte

### 2.2.1 Arbeitsmaterialien

|                                     |                                       |
|-------------------------------------|---------------------------------------|
| Hypercassette™                      | Amersham, Buckinghamshire, UK         |
| Hyperfilm™MP                        | Amersham, Buckinghamshire, UK         |
| Filterpapier                        | Amersham Biosciences, Uppsala, SE     |
| Küvetten (10x10x45mm)               | Sarstedt, Nümbrecht                   |
| Lochplatten / Falcon® wells         | Becton Dickinson, Le Pont De Claix, F |
| Neubauer Zählkammer                 | Marienfeld, Lauda-Königshofen         |
| Nitrozellulose-Transfermembran      | Schleicher & Schuell, Dassel          |
| PCR Tubes                           | Sarstedt, Nümbrecht                   |
| Pipetten                            | Corning Inc., Corning, NY, USA        |
| Rührspatel                          | Sarstedt, Nümbrecht                   |
| Zellkulturflaschen                  | Nalge Nunc, Roskilde, DK              |
| Zellschaber                         | Nalge Nunc, Naperville, IL, USA       |
| Zentrifugenröhrchen / Eppendorfcups | Eppendorf, Wesseling-Berzdorf         |
| Zentrifugenröhrchen / Falcon® Tubes | Becton Dickinson, Le Pont De Claix, F |

### 2.2.2 Geräte

|   |                          |
|---|--------------------------|
| Analysenwaage Sartorius, CP622-0CE        | Sartorius, Göttingen     |
| CO <sub>2</sub> - Brutschrank BB 6220     | Heraeus, Hanau           |
| CO <sub>2</sub> - Brutschrank BB 16       | Heraeus, Hanau           |
| Desaga ProViDoc                           | Desaga, Wiesloch         |
| Docu-Gel IV-System                        | MWG-Biotech, Ebersberg   |
| Elektrophoresekammer Minigel Twin         | Biometra, Göttingen      |
| Elektrophoresesystem A2 Gator™ horizontal | Owl, Portsmouth, NH, USA |

|                                       |                                  |
|---------------------------------------|----------------------------------|
| Power Pack P25                        | Biometra, Göttingen              |
| ELISA-Reader Spectra Rainbow F039046  | SLT Labinstruments, Crailsheim   |
| ELISA-Waschautomat Columbus SLT M8/4R | SLT Labinstruments, Crailsheim   |
| Entwicklerautomat Fuji FPM 800A       | Fujifilm, Düsseldorf             |
| Fluoreszenzmikroskop Axiovert 135     | Zeiss, Jena                      |
| Gene Quant II RNA/DNA Calculator      | Pharmacia, Freiburg              |
| Graphitelektroden Nova Blot           | Pharmacia, Freiburg              |
| Magnetrührer IKAMAG RET               | IKA-Labortechnik, Staufen        |
| pH-Meter 766 Calimatic                | Knick, Berlin                    |
| Präzisionswaage Basic MCBB100         | Sartorius, Göttingen             |
| Schütteltisch IKA-Schüttler MTS 2     | IKA-Labortechnik, Staufen        |
| <i>semi-dry</i> -Blotter              | Pharmacia, Freiburg              |
| Spektralphotometer UV-160A            | Shimadzu, Griesheim              |
| Sterilbank Hera Safe 12/2             | Heraeus, Hanau                   |
| Sterilbank LaminAir HB 2448           | Heraeus, Hanau                   |
| Thermocycler T3 TrioThermoblock       | Biometra, Göttingen              |
| Thermomixer 5436                      | Eppendorf, Hamburg               |
| Ultraschall Sonoplus HD-70            | Bandelin, Berlin                 |
| Vortexer Reax 2000                    | Heidolph Instruments, Schwalbach |
| Wipptisch WT 16                       | Biometra, Göttingen              |
| Zentrifuge Biofuge fresco 15R         | Heraeus, Hanau                   |
| Zentrifuge Rotana TRC                 | Hettich, Tuttlingen              |

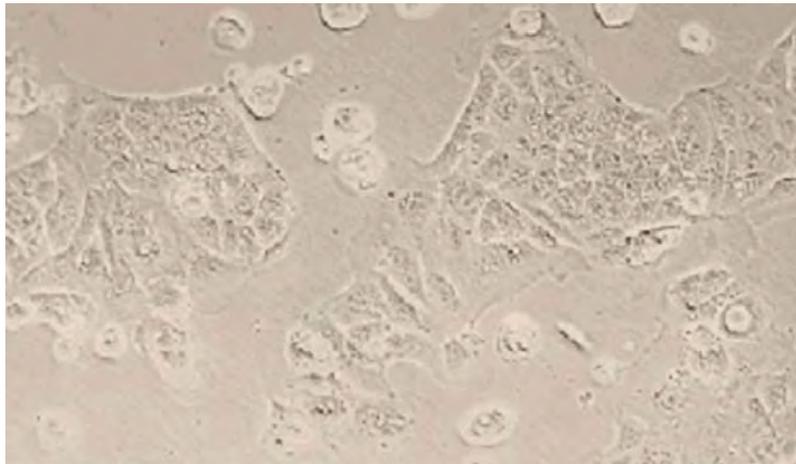
## 2.3 Zelllinien

### 2.3.1 Die Zelllinie Caco-2

Die Zelllinie Caco-2 wurde 1974 von Jørgen Fogh am Memorial Sloan-Kettering Cancer Center, Rye, New York, etabliert [327]. Die Zellen wurden aus einem Kolonadenokarzinom eines 72-jährigen kaukasischen Patienten isoliert und dienen seitdem weltweit in *in vitro* Studien als Untersuchungsmodell. Inzwischen gehört das Caco-2 Zellkulturmodell zu den am besten charakterisierten intestinalen Zellkulturmodellen [328;329]. Caco-2 Zellen differenzieren unter Standardkulturbedingungen nach ca. 20 Tagen Postkonfluenz spontan, ihre Verdopplungszeit beträgt ca. 80 Stunden [330]. Die Zellen wurden von der *American Type Culture Collection* (ATCC) bezogen und die Passagen 30-50 für die Versuche eingesetzt. **Abbildung 2.1** zeigt eine mikroskopische Aufnahme eines subkonfluenten Caco-2 Monolayers.

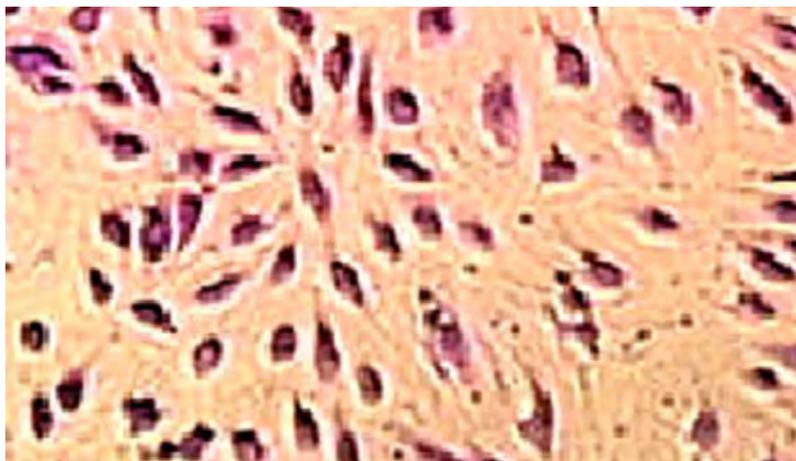
### 2.3.2 Die Zelllinie HUVEC

Die Zelllinie HUVEC (*human umbilical vein endothelial cell*) entstammt der Umbilikalvene eines männlichen kaukasischen Embryos. Die Zellen sind nicht transformiert und die funktionellen Eigenschaften normaler Endothelzellen sind erhalten. Ihre Lebensdauer *in vitro* ist limitiert [331;332]. Die Zelllinie wurde von der *American Type Culture Collection* (ATCC) bezogen und die Passagen 2-10 für die Untersuchungen verwendet. **Abbildung 2.2** zeigt eine mikroskopische Aufnahme eines subkonfluenten HUVEC Monolayers.



---

**Abbildung 2.1** **Caco-2 Kolonadenokarzinomzellen in Kultur**  
(200fache Vergrößerung)



---

**Abbildung 2.2** ***Human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) in Kultur***  
(500fache Vergrößerung, angefärbt mit Kristallviolett)

## 2.4 Zellkulturtechnik

### 2.4.1 Kultivierung der Zellen

Beide Zelllinien wurden im CO<sub>2</sub>-Brutschrank bei 37°C in 95% Luft und 100% Luftfeuchtigkeit sowie einer konstanten CO<sub>2</sub>-Zufuhr von 5% in Zellkulturflaschen (175 cm<sup>2</sup>) kultiviert. Als Nährmedium für die Caco-2 Zellen diente Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium (DMEM). HUVECs wurden in Medium M 199 with Earle`s Salt kultiviert. Alle zwei bis drei Tage wurde das verbrauchte Medium mittels einer Wasserstrahlpumpe abgesaugt und durch 25 ml frischen Mediums ersetzt. Zur Überprüfung der Zellmorphologie und zur Untersuchung auf etwaige bakterielle und/oder mykologische Kontaminationen wurden die Zellen vor jedem Mediumwechsel mikroskopisch betrachtet. Innerhalb des Labors wurden die Zellkulturen routinemäßig einmal monatlich auf Mykoplasmenfreiheit getestet.

- Nährmedium für Caco-2 Zellen:
  - Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium (DMEM) mit Zusatz von:
    - 10% [v/v] FCS
    - 100 µg/ml Streptomycin
    - 100 IE/ml Penicillin
    - 1% [v/v] nicht-essentielle Aminosäuren 10 mM (100x)  
Konzentration: Glycin (750 mg/L), L-Alanin (890 mg/L), L-Asparagin (1320 mg/L),  
L-Asparaginsäure (1330 mg/L), L-Glutaminsäure (1470 mg/L),  
L-Prolin (1150 mg/L), L-Serin (1050 mg/L)
    - 1% [v/v] Pyruvat 500 mM
- Nährmedium für HUVECs:
  - M 199 with Earle`s Salt mit Zusatz von:
    - 20% [v/v] FCS
    - 20 ng/ml FGF-acidic
    - 5 µg/ml Gentamicin
    - 17,6 IE/ml Heparin

### 2.4.2 Passagieren der Zellen

Bei einer 80-90%igen Konfluenz der Caco-2 Zellen bzw. 90-100%igen Konfluenz der HUVECs erfolgte regelhaft die Subkultivierung. Hierzu wurde das Nährmedium mittels Wasserstrahlpumpe abgesaugt und die Zellen zweimal mit 10 ml Dulbecco's Phosphatgepufferter NaCl-Lösung (PBS) gespült, um auch Reste des Mediums - und mit diesen auch die im foetalen Kälberserum enthaltenen Trypsininhibitoren - vollständig zu entfernen. Nach Zugabe von 10 ml Trypsin-EDTA-Lösung folgte bei Caco-2 Zellen eine ca. 10-minütige, bei HUVECs eine ca. 2-minütige Inkubation bei 37°C im CO<sub>2</sub>-Brutschrank, während der sich die Zellen vom Flaschenboden und aus ihrem Verband lösten. Der Ablösevorgang wurde lichtmikroskopisch kontrolliert und teilweise mittels leichten Klopfens gegen die Flaschenwand erleichtert. Nach vollständiger Ablösung wurden 10 ml Kulturmedium zur Zellsuspension gegeben, um den Trypsinierungsvorgang zu beenden. Die Flüssigkeit wurde nun zum Zweck der Vereinzelung der Zellen 10-15 x mit einer Pipette auf- und abgesaugt. Die Zellsuspension wurde anschließend in ein steriles Zentrifugenröhrchen überführt. Zur Bestimmung der Zellzahl wurden 80 µl der Zellsuspension abgenommen, mit 20 µl Trypanblau versetzt und die vitalen Zellen in einer Neubauer Zählkammer ausgezählt. Die Zellsuspension im Zentrifugenröhrchen wurde 10 min bei 750 x g (1.500 upm) zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt und die Zellen in frischem Kulturmedium resuspendiert. Anschließend erfolgte in erwünschter Verdünnung die Aussaat der Zellen in neue Zellkulturflaschen oder Lochplatten.

Alle Arbeiten mit Zellkulturen erfolgten unter sterilen Bedingungen.

- PBS-Lösung: Dulbecco's phosphatgepufferte NaCl-Lösung  
140 mM NaCl  
2,8 mM KCl  
8 mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>  
1,5 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>  
ohne Kalzium und Magnesium  
in Aqua bidest., pH 7,4
- Trypsin-EDTA-Lösung  
0,25% [w/v] Trypsin  
1% [w/v] EDTA  
in PBS

## 2.5 Gewinnung zellulärer Proteine

Die Caco-2 Zellen wurden in Zellkulturflaschen ( $80 \text{ cm}^2$ ) in einer Dichte von  $0,6 \times 10^4$  Zellen/ $\text{cm}^2$  ausgesät. Bei Erreichen einer ca. 90%igen Konfluenz wurde das Nährmedium abgesaugt, die Zellen zweimalig mit PBS (10 ml) gewaschen und die Flüssigkeit wieder entfernt. Die Zellen wurden anschließend mit FCS-freiem Medium unter Zusatz der spezifischen Behandlungsstoffe im  $\text{CO}_2$ -Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der angegebenen Inkubationsperioden wurde das Medium entfernt und die Zellen mit gekühltem PBS vorsichtig gewaschen. Nach dessen Absaugen wurden 500  $\mu\text{l}$  frisches kaltes PBS in jede Kulturflasche gegeben. Die mittels eines Zellschabers vom Flaschenboden gelösten Zellen wurden in auf Eis stehende Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt, denen zur Hemmung des Proteinabbaus Proteaseinhibitoren zugegeben wurden. Zum Zellaufschluss wurden die Proben mittels Ultraschallsonde  $2 \times 5 \text{ s}$  homogenisiert und anschließend in einer Kühlzentrifuge bei 10.000 upm und  $4^\circ\text{C}$  für 10 min zentrifugiert. Der gewonnene Überstand mit enthaltenen Proteinen über dem aus Zelltrümmern bestehenden Pellet wurde in andere Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und im Anschluss der jeweilige Proteingehalt bestimmt.

## 2.6 Quantitative Proteinbestimmung nach Bradford

Die quantitative Proteinbestimmung erfolgte mit dem BioRad Protein Assay und basiert auf der Proteinbestimmungsmethode nach Bradford [333]. Durch Bindung des Farbstoffes Coomassie Brilliant Blau G-25 an positiv geladene Proteine tritt eine Veränderung im Absorptionsmaximum des Farbstoffes von 465 nm (protonierte braunrote kationische Form) zu 595 nm (unprotonierte blaue anionische Form) ein.

In einer Küvette wurden jeweils 2,5 ml BioRad Reagenz (BioRad Konzentrat 1:5 verdünnt mit  $\text{H}_2\text{O}$ ), 50  $\mu\text{l}$  Ameisensäure (ca. 98%ig) sowie 10  $\mu\text{l}$  des gewonnenen Probenüberstandes (s. Kap. 2.5) bzw. 10  $\mu\text{l}$  Aqua bidest. als Blindwert mit einem Kunststoffspatel vermischt. Nach 5 min wurde die Absorption bei 595 nm mit einem Spektralphotometer gegen den Blindwert gemessen und die Proteinkonzentration mittels einer linear gemittelten Standardkurve bestimmt. Als Proteinstandard diente Rinderserumalbumin. Die Angabe der Proteinmenge erfolgte in mg Protein pro ml Lösung.

Das Zellhomogenat wurde für spätere Proteinanalysen mit PBS auf  $1\text{-}3 \mu\text{g Protein}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  verdünnt, zu je 10-30  $\mu\text{l}$  aliquotiert und anschließend bei  $-80^\circ\text{C}$  gelagert.

## 2.7 Immunologischer Nachweis von Proteinen (Western Blot)

Der Nachweis spezifischer Proteine erfolgte mittels der Western Blot-Methode nach Towbin *et al.* [334]. Die in den Zellhomogenaten enthaltenen Proteine werden nach elektrophoretischer Auftrennung auf eine Membran transferiert und mit Hilfe spezifischer Antikörper nachgewiesen.

### 2.7.1 SDS-PAGE

Die elektrophoretische Auftrennung von Proteinen basiert auf der Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach Laemmli [335], bei der die Proteinfraction der Probe im elektrischen Feld entsprechend ihrer negativen Ladung bzw. ihres Molekulargewichtes aufgetrennt wird.

Nach Probengewinnung und -aufbereitung (s. Kap. 2.5 und 2.6) wurde das Zellhomogenat mit dem Probenpuffer Roti<sup>®</sup>-Load im Verhältnis 3:1 gemischt, unter Schütteln gekocht (3 min, 95°C) und je nach Molekulargewicht des zu bestimmenden Proteins auf ein 7,5 - 12,5%iges SDS-Polyacrylamidgel aufgetragen. Zur späteren Identifizierung des Proteins wurde der Molekulargewichtsmarker Precision Plus Protein<sup>™</sup> Standards, Dual Color verwendet. Nach Einsetzen des Gels und Auffüllen der Elektrophoresekammer mit Laufpuffer erfolgte die Elektrophorese über durchschnittlich 1,5 Stunden bei 300 V und 25 mA.

- Sammelgellösung für ein 5%iges Gel (2 ml/Gel):  
0,33 ml 30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid  
0,4 ml Tris/HCl (0,625 M), 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% (12,5 %):  
1,5 ml (2,5 ml) 30% Acrylamid, 0,8% Bisacrylamid  
1,2 ml Tris/HCl (1,88 M), pH 8,8  
1,2 ml SDS (0,5%)  
5 µl TEMED

30 µl APS (10 %)  
in Aqua bidest.

- Laufpuffer  
200 mM Glycin  
25 mM Tris  
1% [w/v] SDS  
in Aqua bidest.

### 2.7.2 Proteintransfer auf Nitrozellulose

Der Proteintransfer erfolgte mittels einer *semi-dry*-Blottapparatur. Die im Gel befindlichen Proteine wandern in Richtung Anode und werden auf eine in Blot-Puffer getränkte Nitrozellulosemembran transferiert. Der Proteintransfer erfolgte bei 55 mA pro Gel für ca. 1 Stunde. Der Erfolg der Proteinübertragung wurde durch ca. 2-minütige Inkubation mit Ponceau-S-Färbelösung überprüft und die Membran anschließend durch mehrmaliges Waschen mit TBS-T wieder entfärbt.

- Blot-Puffer, pH 8,3:  
50 mM Tris  
40 mM Glycin  
20% [v/v] Methanol  
0,0375% [w/v] SDS  
in Aqua bidest.
- Ponceau-S-Färbelösung  
0,1% [w/v] Ponceau-S  
1% [v/v] Essigsäure  
in Aqua bidest.

- Tris-Puffer (TBS, konz.)  
1,0 M NaCl  
0,1 M Tris-Base  
in Aqua bidest., pH 7,5
- TBS-T :  
10% [v/v] TBS (konz.)  
0,05% [v/v] Tween-20  
in Aqua bidest.

### 2.7.3 Immunchemische Detektion mittels Chemilumineszenz

Die Nitrozellulosemembran wurde für 60 min bei Raumtemperatur auf einem Schütteltisch oder über Nacht bei 4°C in Blockpuffer inkubiert, um unspezifische Proteinbindungsstellen zu blockieren. Nach 3 x 5-minütigem Waschen mit TBS-T wurde sie mit dem spezifischen Erstantikörper, der in 8 ml Blockpuffer gelöst wurde, für weitere 60 min auf dem Schütteltisch inkubiert. Nach Waschen mit TBS-T folgte ein 30-minütiger Inkubationsschritt mit *horse radish peroxidase* (HRP) - konjugiertem Zweitantikörper, der ebenfalls in 8 ml Blockpuffer gelöst wurde (Schütteltisch). Durch erneutes Waschen mit TBS-T (3 x 10 min) wurden die unspezifisch angelagerten Liganden entfernt. Es folgte die Detektion mittels Chemilumineszenz: nach Mischen der SuperSignal<sup>®</sup> Enhancer Solution und der SuperSignal<sup>®</sup> Peroxide Solution im Verhältnis 1:1 und 5 min Einwirkdauer wurde die durch die Meerrettichperoxidase katalysierte Lichtreaktion (Oxidationsreaktion mit anschließender Lichtemission) durch Auflegen eines Röntgenfilmes dokumentiert. Der Röntgenfilm (Hyperfilm<sup>TM</sup>MP) wurde je nach Signalstärke und Hintergrund zwischen 1 s und 15 min exponiert und anschließend entwickelt. Als quantitative Kontrolle diente die anschließende Bestimmung von  $\beta$ -Actin in den Proben (analoges Vorgehen).

- Erstantikörper  
  
Akt2 (F7)                      anti-Akt2, mouse IgG, monoklonal, 200  $\mu$ g/ml  
    Endkonzentration: 1:100 in Blockpuffer

- |                  |   |
|------------------|---|
| β-Actin          | anti-β-Actin, goat IgG, polyklonal, 200 µg/ml<br>Endkonzentration: 1:2000 in Blockpuffer          |
| FGF-2            | anti-FGF-2, rabbit IgG, polyklonal, 200 µg/ml<br>Endkonzentration 1:250 in Blockpuffer            |
| HIF-1 α          | anti-HIF-1 α, mouse IgG, monoklonal, 250 µg/ml<br>Endkonzentration: 1:250 in Blockpuffer          |
| p-Akt 1/2/3      | anti-p-Akt 1/2/3, rabbit IgG, polyklonal, 200 µg/ml<br>Endkonzentration: 1:1000 in Blockpuffer    |
| PI 3-kinase p85α | anti-PI 3-kinase p85α, mouse IgG, monoklonal, 200 µg/ml<br>Endkonzentration: 1:100 in Blockpuffer |
| VEGF (Ab-3)      | anti-VEGF, mouse IgG, monoclonal, 100 µg/ml<br>Endkonzentration: 1:200 in Blockpuffer             |
- Zweitantikörper
 

|                 |   |
|-----------------|---|
| anti-goat IgG   | HRP-konjugiert, 200 µg/ml<br>Endkonzentration: 1:2000 in Blockpuffer      |
| anti-mouse IgG  | HRP-konjugiert, 400 µg/ml<br>Endkonzentration: 1:2000 in Blockpuffer      |
| anti-rabbit IgG | Peroxidase-konjugiert, 1 mg/ml<br>Endkonzentration: 1:2000 in Blockpuffer |
  - Blockpuffer
    - 3% [w/v] Magermilchpulver
    - in TBS-T

## 2.8 Gewinnung von Caco-2 Zellkulturüberständen

Caco-2 Zellen wurden in Zellkulturflaschen (175 cm<sup>2</sup>) in einer Dichte von 1,7 x 10<sup>4</sup> Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät. Bei Erreichen einer ca. 90%igen Konfluenz wurde das Nährmedium abgesaugt, die Zellen zweimalig mit 10 ml PBS gewaschen und die Flüssigkeit wieder entfernt. Anschließend wurden die Zellen mit FCS-freiem Medium unter Zusatz der spezifischen Behandlungsstoffe im CO<sub>2</sub>-Brutschrank inkubiert. Nach Ablauf der angegebenen

Inkubationsperioden wurden jeweils 10 ml Medium abgenommen. Dieses sog. **konditionierte Medium** wurde in Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei 10.000 upm und 4°C zentrifugiert, um abgelöste Zellen bzw. Zellreste zu entfernen. Anschließend wurden die Überstände in Eppendorf-Gefäße aliquotiert und bis zur Auswertung bei –20°C gelagert.

## **2.9 Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) zur Quantifizierung von VEGF**

Der Enzyme-linked Immunosorbent Assay (ELISA) zur Quantifizierung von VEGF basiert auf dem Prinzip eines *Sandwich*-ELISA, bei dem die Detektion des zu bestimmenden Proteins mit Hilfe zweier Antikörper erfolgt. Die gegen das zu bestimmende Antigen gerichteten spezifischen Antikörper (Erstantikörper) sind an ein Trägermaterial adsorbiert oder chemisch gekoppelt und binden während der Inkubation mit der Probe darin vorhandenes Antigen. Nach Entfernung der frei in Lösung verbliebenen Antigene durch einen Waschschrift lagern sich – in einem nachfolgenden Schritt zugefügte und mit einem Enzym markierte – Antikörper (Zweitantikörper) an die gebildeten Immunkomplexe. Der Überschuss an Zweitantikörpern wird durch einen weiteren Waschvorgang entfernt. Das Enzym (z.B. Meerrettichperoxidase oder alkalische Phosphatase) katalysiert eine Farbreaktion, die kolorimetrisch oder photometrisch erfasst werden kann. Die Stärke der Farbreaktion korreliert direkt mit dem Antigengehalt der Probe.

Zur Bestimmung der VEGF-Konzentration in den Caco-2 Zellkulturüberständen (s. Kap. 2.8) wurde der *CytElisa™ Human VEGF* verwendet und entsprechend der Testanleitung durchgeführt. Die semiquantitative Auswertung erfolgte photometrisch mit dem ELISA-Reader Spectra Rainbow.

## **2.10 RT-kompetitive Multiplex-PCR**

Zum besseren Verständnis der RT-kompetitiven Multiplex-PCR wird zunächst auf die reguläre PCR, die RT-PCR, die RT-Multiplex-PCR sowie die kompetitive PCR eingegangen.

Die **PCR** (*polymerase chain reaction*, Polymerasekettenreaktion) ist eine in den Achtziger Jahren entwickelte Methode zur *in vitro* Amplifikation eines definierten DNA-Fragmentes [336]. Kary Mullis wurde für diese Erfindung 1993 mit dem Nobelpreis ausgezeichnet [337].

Der PCR-Reaktion (s. **Abb. 2.3**) liegt folgendes Prinzip zugrunde:

*1. Denaturierung*

Durch Hitzedenaturierung trennen sich die beiden Stränge der *Template*-DNA, welche die zu vermehrende Sequenz enthält.

*2. Primeranlagerung / Annealing*

Zwei chemisch synthetisierte Oligonukleotid-Einzelstränge, sogenannte Primer, binden an ihre Zielsequenzen an der nun als Einzelstränge vorliegenden komplementären DNA-Matrize (*Target*-DNA) und markieren so den zu amplifizierenden Abschnitt.

*3. Elongation / Polymerisierung*

Eine hitzestabile DNA-Polymerase (*Taq*-Polymerase aus dem thermophilen Bakterium *Thermus aquaticus*) verlängert die gebundenen Primer, indem sie freie Desoxynukleotid-Triphosphate (dNTPs) an das unmodifizierte 3'-Ende des Oligonukleotids bindet.

Bei der **RT-PCR** werden zu bestimmende RNA-Moleküle zunächst durch Reverse Transkription (RT) in eine *copy*-DNA (cDNA) umgeschrieben und anschließend amplifiziert. Wird in der PCR mehr als ein Primerpaar eingesetzt, spricht man von einer Multiplex-PCR. Die **RT-Multiplex-PCR** basiert darauf, dass bestimmte Gene sehr konstant exprimiert werden und das zugehörige mRNA-Produkt ebenfalls in ausreichend konstanter Konzentration in den Zellen vorliegt. Kennt man dessen Konzentration, können nach Reverser Transkription die Amplifikationsprodukte dieses Kontrollgens und der interessierenden cDNA in Beziehung gesetzt werden. Ein Beispiel für ein derartiges Kontrollgen ist GAPDH (Glyceraldehyd-3-phosphat-Dehydrogenase), es kann als sogenannter endogener Standard dienen. Die Amplifikation des Standards kann in demselben Reaktionsansatz (als interner Standard) oder in einem vom Zielgen getrennten Reaktionsansatz (als externer Standard) stattfinden.

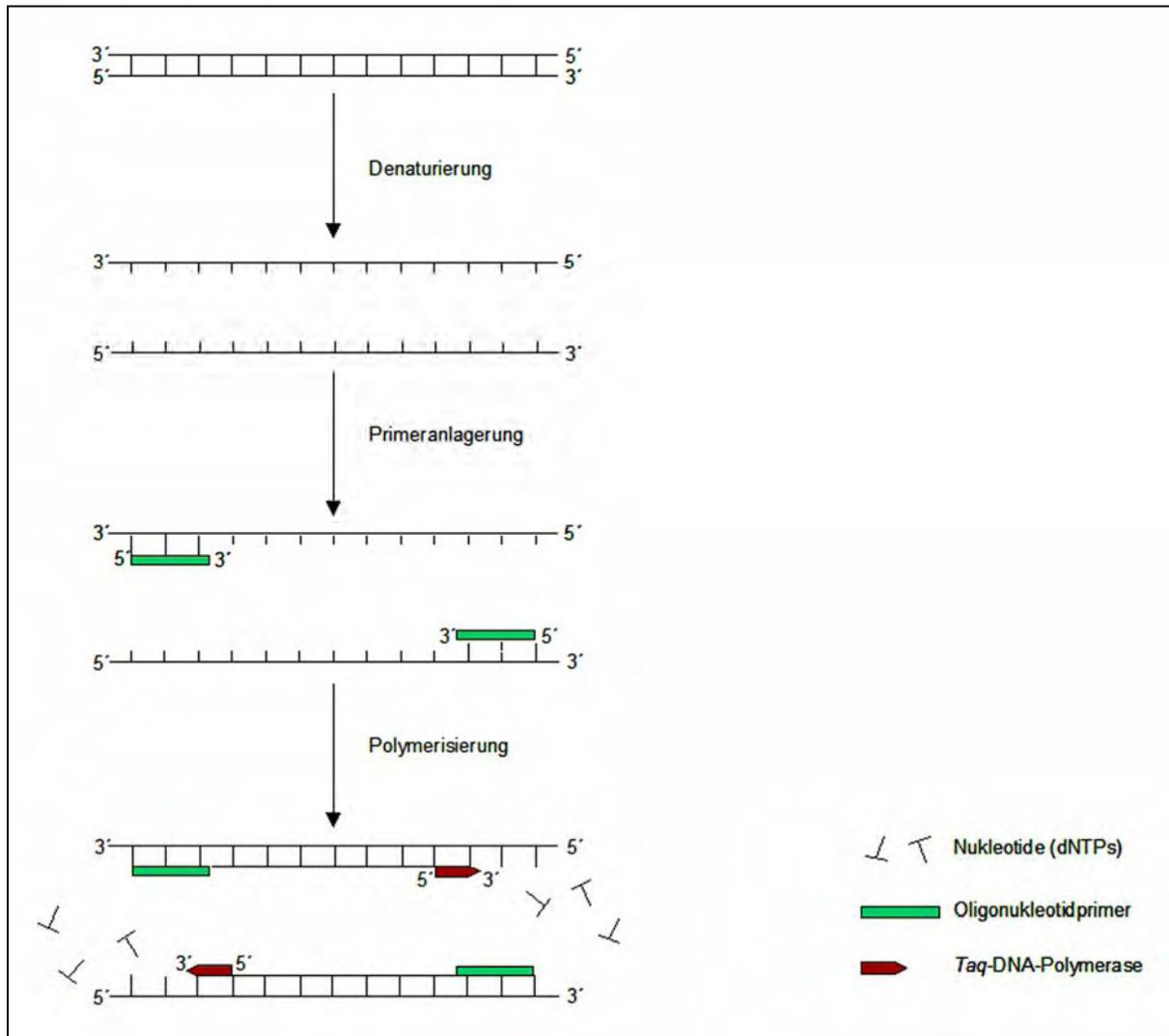
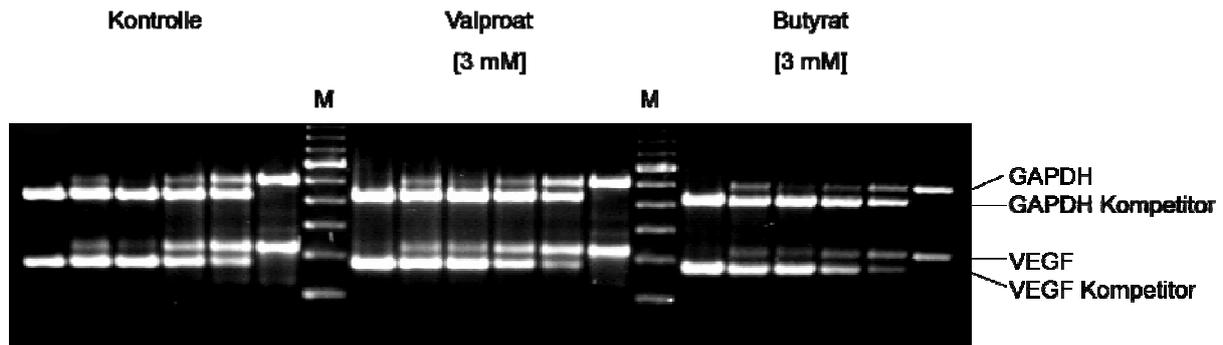


Abbildung 2.3 Prinzip der Polymerasekettenreaktion (PCR)

Die **kompetitive PCR** basiert auf der kompetitiven Coamplifizierung einer spezifischen Zielsequenz zusammen mit bekannten Konzentrationen eines internen Standards in demselben Reaktionsansatz [338]. Der interne Standard (IST), auch exogener, interner Standard oder Kompetitor genannt, wird so konstruiert, dass er mit den gleichen Primern wie die Zielsequenz amplifiziert wird und folglich auch mit gleicher Effizienz.

Um die beiden Amplifikationsprodukte nach der elektrophoretischen Auftrennung unterscheiden zu können, muss der Standard modifiziert werden. Dies geschieht beispielsweise durch Hinzufügen oder wie hier angewandt durch die Deletion von Gensequenzen, wodurch der Standard eine vom Wildtyp abweichende Basenlänge aufweist.



**Abbildung 2.4** Beispiel einer RT-kompetitiven Multiplex-PCR

Stellt man eine Verdünnungsreihe des Kompetitors her und versetzt diese mit gleichen Mengen an Probe, wird die Zielsequenz je nach Konzentration des enthaltenen Kompetitors mehr oder weniger amplifiziert. In demjenigen Ansatz, in dem beide Sequenzen gleich stark vermehrt werden, haben sich die Ausgangskonzentrationen von exogener Standard- und endogener Zielsequenz entsprochen. Da die jeweils zugegebene Standardmenge bekannt ist, kann auf die vorhandene Menge des Zielgens geschlossen werden.

Bei der **RT-kompetitiven Multiplex-PCR** (RCMP, s. **Abb. 2.4**) handelt es sich um eine Kombination von RT-Multiplex-PCR und kompetitiver PCR, bei der mehrere Gene gleichzeitig bestimmt werden können [339;340]. Hierbei werden sowohl die Zielsequenz mit entsprechendem Kompetitor als auch ein Referenzgen (GAPDH), ebenfalls mit entsprechendem Kompetitor (GAPDH IST oder GAP-IST) zusammen in einem Reaktionsansatz amplifiziert. Es handelt sich also um gemischt exogene/endogene interne Standards.

Nach elektrophoretischer Auftrennung der Proben werden die Verhältnisse zwischen Zielsequenz und Kompetitor bzw. Referenzgen und seinem entsprechenden Kompetitor bestimmt. Am jeweiligen Umschlagpunkt ist zu erkennen, wo beide in gleichen Mengen vorhanden sind. Hier entspricht die in der Probe enthaltene mRNA-Menge der Menge an GAPDH IST. Im Gegensatz zur kompetitiven PCR muss bei dieser Methode nicht die exakt gleiche Menge an Probe jedem Ansatz zugesetzt werden, um genaue Ergebnisse zu erzielen.

### 2.10.1 RNA-Isolierung

Das Verfahren der RNA-Isolierung basiert auf der Methode von Chomczynski und Sacchi [341]. Nach Aussaat der Caco-2 Zellen in 6-Lochplatten ( $6,2 \times 10^4$  Zellen/cm<sup>2</sup>) erreichten diese nach durchschnittlich 48 Stunden eine 90%ige Konfluenz und wurden dann mit den spezifischen Behandlungssubstanzen inkubiert. Zu den angegebenen Zeitpunkten wurde das Medium jeweils abpipettiert und die Zellen durch Zugabe von 600-1000  $\mu$ l RNAbee™ lysiert (*Homogenisierung*). Anschließend wurde das Zelllysat in Zentrifugenröhrchen überführt und nach Zusatz von jeweils 200  $\mu$ l Chlorophorm 15-20 s gevortext. Nach 5-minütiger Inkubation auf Eis erfolgte die Zentrifugation der Proben (15 min, 12.000 upm, 4°C), die zu einer Phasentrennung führte: die untere, blaue Phenol- und Chlorophorm-haltige Phase enthält DNA und Proteine; in der oberen, klaren und wässrigen Phase befindet sich die RNA. Der klare Überstand wurde in neue Eppendorf-Reaktionsgefäße überführt und mit 1 Vol. Isopropanol versetzt. Nach kurzem Vortexen und 10-minütiger Inkubation bei Raumtemperatur folgte ein weiterer Zentrifugationsschritt (10-15 min, 12.000 upm), nach dem ein weiß-gelbliches RNA-Pellet am Grund sichtbar wird. Anschließend wurde der Überstand abpipettiert und das RNA-Präzipitat mit 200  $\mu$ l 70%igem Ethanol gewaschen. Nach erneuter Zentrifugation (5 min, 7.500 upm) und Entfernung des Überstandes wurde nach kurzer Lufttrocknung das RNA-Pellet in 50  $\mu$ l Aqua bidest. rückgelöst. Es folgte eine 10-minütige Inkubation bei 55-60°C und kurzes Vortexen. Die Konzentration und der Reinheitsgrad (*Ratio*) der gewonnenen RNA wurde photometrisch bestimmt. Hierzu wurde eine 1:10-Verdünnung von Probe und Aqua bidest. (8  $\mu$ l bzw. 72  $\mu$ l) bei einer Wellenlänge von 260 nm gemessen.

Um die Gefahr des RNA-Abbaus durch RNAsen bzw. die Kontamination durch Fremd-DNA zu minimieren, wurden bei allen Arbeitsschritten autoklavierte Gefäße und Pipetten verwendet.

### 2.10.2 Reverse Transkription der RNA in cDNA

Die isolierte zelluläre RNA wurde in der folgenden RT-Reaktion in cDNA umgeschrieben. Zu diesem Zweck wurden jeweils 3,5  $\mu$ g Gesamt-RNA mit 500 ng Random-Hexamer-Primern und soviel Aqua bidest. versetzt, dass ein Gesamtvolumen von 12  $\mu$ l resultierte. Der Reaktionsansatz wurde 10 min bei 70°C inkubiert (*Denaturierung*) und anschließend sofort

auf Eis abgekühlt, um die erneute Ausbildung von Sekundärstrukturen zu vermeiden. Nach Zusatz von 4 µl RT-Puffer, 2 µl DTT (0,1 M) und 1 µl Nukleotiden (dNTP Master Mix), kurzem Abzentrifugieren und 5-minütiger Inkubation bei 25°C (*Primeranlagerung*) folgte nach 1-minütiger Inkubation bei 42°C der Zusatz von 1 µl Reverser Transkriptase (SuperScript™ II H<sup>-</sup> Reverse Transkriptase, 200 U/µl). Auf eine Inkubationszeit von 1 h bei 42°C (*Polymerisierung*) folgten ein Denaturierungsschritt (15 min, 70°C) und die Abkühlung auf 0°C. Die anschließende Lagerung der cDNA-Proben erfolgte bei -20°C.

Die Inkubationsschritte wurden im Thermocycler T3 TrioThermoblock durchgeführt.

- 5 x RT-Puffer (First Strand):  
250 mM Tris-HCL, pH 8,3  
375 mM KCl  
15 mM MgCl<sub>2</sub>

### **2.10.3 Konstruktion des internen Standards (Kompetitor)**

Der interne Standard wird so konstruiert, dass er die gleichen Primerbindungsstellen wie der Wildtyp aufweist und folglich mit gleicher Effizienz amplifiziert wird. Um später die Unterscheidung der beiden PCR-Produkte zu ermöglichen, wird ein Teil der Gensequenz der Zielregion des Kompetitors deletiert. Dadurch wird das entsprechende Amplifikat kürzer als das des Wildtyps (Methode nach Celi *et al.*, 1993 [342]).

Zur Herstellung des verkürzten Standards wurde ein Primerkonstrukt (CB) eingesetzt. Das 5'-Ende (B) und das 3'-Ende (C) binden mit gewissem Abstand voneinander an dem zur Zielsequenz komplementären Strang. Dadurch ergibt sich praktisch eine Deletion der dazwischenliegenden Basen und folglich ein PCR-Produkt ohne die zwischen C und B liegenden Nukleotide. Sowohl die Wildtyp-cDNA als auch der Kompetitor lassen sich nun mit den Primern A und B amplifizieren, sind aber aufgrund ihrer unterschiedlichen Größe voneinander zu unterscheiden.

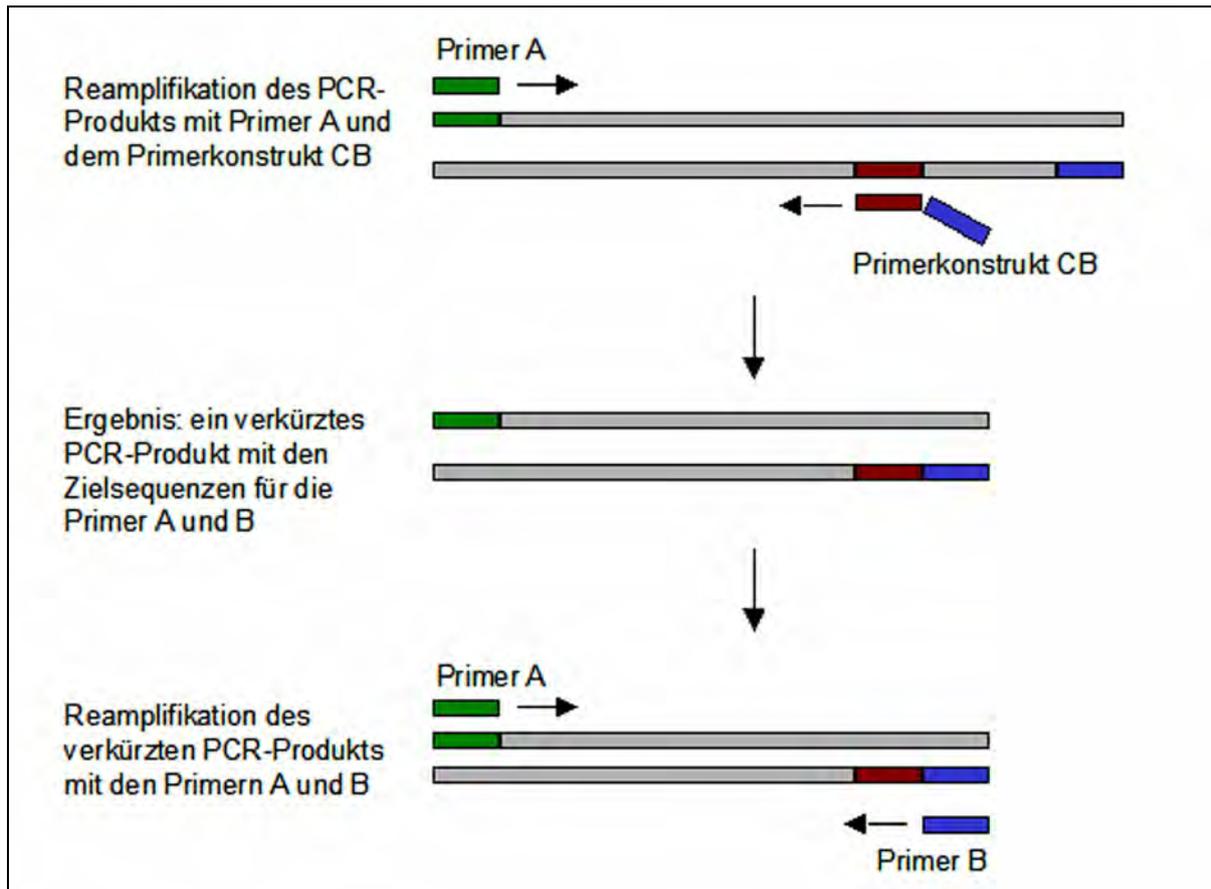


Abbildung 2.5 Konstruktion eines internen Standards für die kompetitive PCR (nach Celi *et al.*, 1993 [342])

#### 2.10.4 Kompetitive Multiplex-PCR

Aus 50  $\mu\text{l}$  Standard (1,5  $\mu\text{l}$  GAP-IST, 1  $\mu\text{l}$  VEGF-CB IST, 47,5  $\mu\text{l}$  Aqua bidest.) wurde eine 1:3 Verdünnungsreihe erstellt und anschließend von jeder Verdünnung jeweils 1  $\mu\text{l}$  in ein PCR-Tube überführt.

Von einem Mastermix aus PCR-Puffer,  $\text{MgCl}_2$  50 mM, dNTPs, Primern (GAPDH 286, GAPDH 788, VEGF-A (67), VEGF-B (289)) und A. bidest. wurden 300  $\mu\text{l}$  mit 4  $\mu\text{l}$  *Taq*-DNA-Polymerase (5 U/ $\mu\text{l}$ ) sowie 2,5–5  $\mu\text{l}$  Templat (cDNA) versetzt. Davon wurden jeweils 48,5  $\mu\text{l}$  zu den verschiedenen Standardverdünnungen gegeben. Nach Überschichtung der Proben mit Mineralöl und kurzem Abzentrifugieren durchliefen die Proben im Thermocycler folgendes Programm: 3 min bei 94°C (*primärer Denaturierungsschritt*) – 45 s bei 94°C (*Denaturierungsphase*) – 45 s bei 58°C (*Primeranlagerung*) – 45 s bei 72°C (*Polymerisierung*). Nach Durchlaufen von insgesamt 34 dieser Zyklen folgte eine 10-minütige Inkubation bei 72°C und die anschließende Lagerung der Proben bei 4°C.

Für alle Arbeitsschritte wurden autoklavierte Reaktionsgefäße und Pipetten verwendet.

- PCR Reaktionspuffer (10x):  
200 mM Tris-HCl, pH 8,4  
500 mM KCl
- Primer
  - GAPDH  
Genbank Ac. Nummer: M33197  
Forward: GAP-286:       atc ttc cag gag cga gat cc  
Backward: GAP-788:     acc act gac acg ttg gca gt  
Backward: GAP-IST:     acc act gac acg ttg gca gta gta gag gca ggg atg atg t  
Länge der Sequenzen: Wildtyp 502 bp, GAPDH-Kompetitor: 427 bp
  - VEGF  
Genbank Ac. Nummer: M32977  
Forward: VEGF-A (67):   tgc tgt ctt ggg tgc att gg  
Backward: VEGF-B (289): aca cag gat ggc ttg aag at  
Backward: VEGF-CB IST: aca cag gat ggc ttg aag att *ctc gat ttg gat ggc agt ag*  
Länge der Sequenzen: Wildtyp 222 bp, VEGF-Kompetitor: 178 bp

### 2.10.5 Agarosegelelektrophorese

Bei der DNA-Elektrophorese werden DNA-Fragmente ihrer Größe nach mittels elektrischer Spannung aufgetrennt. Die Wanderungsgeschwindigkeit hängt dabei von der Größe und der elektrischen Ladung der Moleküle ab. Zum Zweck der Größenauftrennung durchwandern die amplifizierten Nukleinsäuren ein Agarosegel mit einer bestimmten Porengröße; als negativ geladene Moleküle wandern sie im elektrischen Feld in Richtung der Anode. Um das Ergebnis der Gelelektrophorese sichtbar zu machen, wird das Gel mit Ethidiumbromid (EtBr.) – einer Verbindung, die an DNA-Fragmente bindet und Fluoreszenzeigenschaften besitzt – gefärbt.

Zur Herstellung eines 2%igen Agarosegels [w/v] wurden 7 g Agarose mit 350 ml 0,5 x TBE-Puffer in einem Erlenmeyerkolben unter Schwenken erhitzt und in eine Flachbettkammer

gegossen. Nach vollständiger Auspolymerisierung des Gels (nach ca. 30 min) wurde das Gel in eine horizontale Elektrophoresekammer eingesetzt und mit 0,5 x TBE-Puffer überschichtet. Jeweils 10 µl der Proben wurden mit 2 µl Auftragspuffer vermennt und in die Geltaschen pipettiert. Als Marker diente ein 100 bp DNA-Ladder (1,0 µg/µl). Die elektrophoretische Auftrennung der Proben erfolgte über ca. 1,5 Stunden bei 130 V Spannung. Auf die 15-minütige Färbung des Gels in Ethidiumbromid-Gebrauchslösung folgte eine ca. 5-minütige Entfärbung und anschließend die Visualisierung auf einer UV-Lampe. Nach Aufnahme mittels eines Geldokumentationssystems (Doku-Gel IV-System) wurden die Intensitätsunterschiede der Banden am PC ausgewertet und die VEGF-Konzentrationen berechnet.

- 0,5 x TBE-Puffer  
54 g Tris base  
27,5 g Borsäure  
20 ml 0,5 M EDTA (pH 8,0)
- EDTA Lösung (0,5 M)  
18,6% [w/v] EDTA  
in Aqua bidest./ NaOH, pH 8,0
- Auftragspuffer  
0,25% Bromphenolblau  
0,25% Xylen Cyanol  
30% Glyzerol  
in Aqua bidest.
- Ethidiumbromid-Stammlösung  
1% [v/v] Etbr. in Aqua bidest.
- Ethidiumbromid-Gebrauchslösung  
40 µl 1% Etbr.-Stammlösung ad 400 ml 0,5 x TBE-Puffer

## 2.11 Detektion und Quantifizierung der HIF-1 $\alpha$ Aktivierung in nukleären Zellextrakten

Zunächst erfolgte die Gewinnung der nukleären Proteinfraction von Caco-2 Zellen unter Verwendung eines Kernextraktions-Assays (*Nuclear Extract Kit*). Hierzu wurden die Caco-2 Zellen in Zellkulturflaschen (80 cm<sup>2</sup>) in einer Dichte von 0.6 x 10<sup>4</sup> Zellen/cm<sup>2</sup> ausgesät und nach Erreichen einer ca. 90%igen Konfluenz mit den spezifischen Behandlungssubstanzen inkubiert. Nach Ablauf der gewünschten Zeiten wurden zytoplasmatische Zellfraktion und nukleäre Zellfraktion entsprechend der Testanleitung separiert und die nukleären Proteine präpariert. Als Standard bei der Bestimmung der Proteingehalte diente Lysis-Puffer mit enthaltenen Proteaseinhibitoren.

Die gewonnenen nukleären Zellextrakte wurden für die Messung der *hypoxia inducible factor-1 $\alpha$*  (HIF-1 $\alpha$ ) Aktivierung eingesetzt. Dies erfolgte mit Hilfe des *TransAM™ HIF-1 Transcription Factor Assays*, der auf dem Prinzip eines ELISA (s. Kap.2.9) basiert.

Auf einer 96-Lochplatte sind Oligonukleotide, die das *hypoxia response element* (HRE) enthalten, gebunden. In nukleären Zellextrakten enthaltene aktive HIF-Dimere binden spezifisch an dieses Oligonukleotid und werden durch gegen HIF-1 $\alpha$  gerichtete Antikörper detektiert. Nach Zusatz eines mit Meerrettichperoxidase konjugierten Zweitantikörpers kann die enzymatisch katalysierte Farbreaktion photometrisch quantifiziert werden. Für diesen Versuch wurden die Proben mit der nukleären Proteinfraction in einer Konzentration von 1  $\mu\text{g}\cdot\mu\text{l}^{-1}$  Lysis-Puffer verwendet. Als Positivkontrolle zur HIF-1 $\alpha$  Aktivierung wurde *COS-7 nuclear extract* eingesetzt, als Negativkontrolle diente *wild-type consensus* Oligonukleotid (Kompetitor der HIF-Bindung).

## 2.12 Bestimmung der proteasomalen Aktivität im Zellysat

Proteasomen sind die Schlüsselenzyme für die nicht-lysosomale Proteolyse in Eukaryonten. Die Bestimmung der intrazellulären proteasomalen Aktivität von Caco-2 Zellen orientierte sich an der Methode von Orino *et al.* [343] unter Verwendung des *20S Proteasome Activity Assay Kits*. Dieser Test basiert auf der Detektion des Fluorophors 7-Amino-4-methylcoumarin (AMC) nach proteasomaler Abspaltung des Substrates LLVY vom markierten Substrat

LLVY-AMC. Die freie AMC-Fluoreszenz im Zellysate kann unter Einsatz eines Fluorometers quantifiziert werden

Caco-2 Zellen wurden in 6-Lochplatten kultiviert und mit den spezifischen Behandlungssubstanzen inkubiert. Nach Ablauf der angegebenen Inkubationszeiten wurden die Zellen zweimal mit gekühltem PBS gewaschen und in 500 µl Pufferlösung mittels Zellschaber vom Boden gelöst. Zum Zellaufschluss wurden die Proben mittels Ultraschallsonde 3 x 5 s homogenisiert, anschließend zentrifugiert (10 min, 13.000 upm, 4°C) und der Überstand abpipettiert. Das weitere Vorgehen erfolgte entsprechend der Testanleitung. Die freie AMC-Fluoreszenz wurde mit Hilfe des ELISA-Readers Spectra Rainbow bei 380 nm (Referenzwellenlänge 460 nm) bestimmt.

- Pufferlösung  
20 mM Tris HCl (pH 7,5)  
2 mM ATP  
1 mM DTT  
5 mM MgCl<sub>2</sub>

## 2.13 Versuche mit der Endothelzelllinie HUVEC

### 2.13.1 Bestimmung der Zellproliferation mittels BrdU-Test

Die Ermittlung der Zellproliferation erfolgte mit einem Zellproliferations-Kit (BrdU-ELISA). Bei diesem nicht-radioaktiven Test wird das Pyrimidinanalogon 5-Bromo-2'-deoxy-Uridine (BrdU) anstelle von [<sup>3</sup>H]-Thymidin in die DNA der proliferierenden Zelle eingebaut. Nach seiner Inkorporation in die DNA wird das BrdU mittels Immunoassay detektiert.

Die *human umbilical vein endothelial cells* (HUVECs) wurden in 96-Lochplatten ausgesät (10<sup>4</sup> Zellen in 200 µl/well) und für die Dauer von 24 Stunden im CO<sub>2</sub>-Brutschrank inkubiert. Anschließend wurde das Zellkulturmedium verworfen und die Zellen für weitere 24 bzw. 48 Stunden mit konditionierten Medien (s. Kap. 2.8) inkubiert. Nach Zusatz von 10 µl BrdU folgte ein weiterer 4-stündiger Inkubationsschritt. Im Anschluss wurden die Zellen fixiert, die DNA denaturiert und mit Anti-BrdU-POD behandelt, welches an das BrdU in der neu synthetisierten DNA bindet. Die Immunkomplexe wurden durch eine Substratreaktion

detektiert und im ELISA-Reader Spectra Rainbow bei 450 nm (Referenzwellenlänge: 690 nm) quantifiziert.

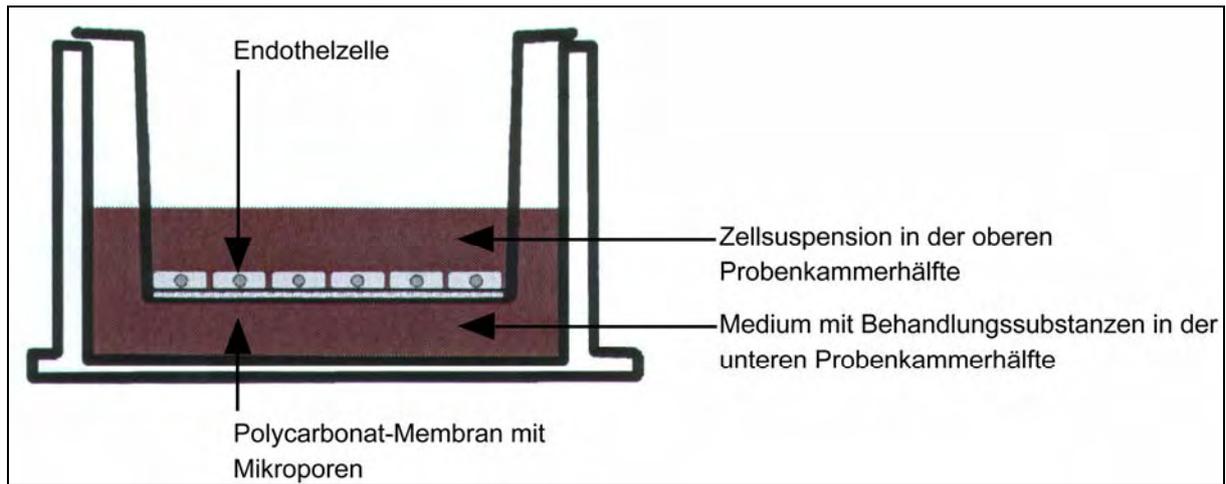
### **2.13.2 Bestimmung der Zellzahl mit Kristallviolett**

Das Prinzip der Zellzahlbestimmung nach Westergren-Thorsson *et al.* [344] basiert darauf, dass mit Kristallviolett inkubierte Zellen diesen Farbstoff zunächst aufnehmen; nach Auswaschung des Farbstoffes ist die Farbintensität der Kristallviolettlösung proportional zur Zellzahl.

Die HUVECs wurden in 96-Lochplatten ausgesät ( $10^4$  Zellen in 200  $\mu$ l/well), 24 Stunden im CO<sub>2</sub>-Brutschrank inkubiert und anschließend mit konditionierten Medien (s. Kap. 2.8) bzw. mit HUVEC-Standardmedium unter Zusatz der spezifischen Behandlungssubstanzen behandelt. Nach den angegebenen Inkubationszeiten wurde das jeweilige Medium entfernt, die Zellen mit 5% Formaldehyd in PBS (200 $\mu$ l/well) für 5 min fixiert, mit PBS gewaschen (200  $\mu$ l/well), mit 0,5%iger Kristallviolettlösung in Aqua bidest. (50  $\mu$ l/well) überschichtet und für 10 min inkubiert. Nach dreimaligem Waschen mit PBS (200  $\mu$ l/well) wurde 33%ige Essigsäure in Aqua bidest. (100  $\mu$ l/well) zugegeben und die Lochplatten anschließend auf einem Schütteltisch 5 min bei einer Schüttelstärke von 300/min geschüttelt (*Entfärbung*). Die Absorption wurde im ELISA-Reader bei 620 nm ohne Referenzfilter gemessen. Dabei korrelierte die Absorption mit der Anzahl der Zellen auf der Platte.

### **2.13.3 Migration**

Die Migration von Endothelzellen wurde entsprechend den Angaben in der Testanleitung des *Cell Invasion Assay Kits* untersucht. Der Test basiert darauf, dass Endothelzellen in Richtung eines Stimulus durch eine Polycarbonat-Membran mit Mikroporen definierter Größe wandern und ermöglicht die Untersuchung einer Migrationshemmung durch exogene Signale. Anhand bildlicher Darstellung bzw. durch Auszählen definierter Bereiche ist man in der Lage, eine qualitative bzw. quantitative Aussage über das Inhibierungspotential der zu testenden Substanzen zu machen.



**Abbildung 2.6 Migration von HUVECs durch eine Polycarbonat-Membran mit Mikroporen** (schematische Darstellung des Versuchsaufbaus)  
 Invasive Zellen migrieren durch die Poren der Membran und haften an ihrer Unterseite. Nicht-invasive Zellen verbleiben auf der Oberseite der Membran

Der Versuchsaufbau (s. **Abb. 2.5**) besteht aus 24-Lochplatten mit speziellen Probenkammern, den sogenannten *Transwells*. Die *Transwells* beinhalten jeweils eine Polycarbonat-Membran mit Mikroporen ( $\text{\O} 8 \mu\text{m}$ ), durch die die Probenkammern in eine obere und eine untere Hälfte geteilt werden. Ziel ist es, die Endothelzellen aus der oberen Probenkammerhälfte durch die Membran in die untere Hälfte wandern zu lassen bzw. diesen Vorgang durch potentielle Inhibitoren zu hemmen.

In die untere Probenkammer wurden jeweils 600  $\mu\text{l}$  HUVEC-Nährmedium mit enthaltenen Behandlungssubstanzen bzw. 600  $\mu\text{l}$  konditionierte Caco-2 Medien (s. Kap. 2.4.6) pipettiert. In die obere Probenkammer wurden HUVECs, die zuvor in Zellkulturmedium mit nur 1% FCS resuspendiert wurden, gegeben ( $10^5$  Zellen/transwell). Während der anschließenden 5stündigen Inkubation im  $\text{CO}_2$ -Brutschrank migrierten die Zellen – stimuliert durch den höheren FCS-Gehalt in der unteren Probenkammerhälfte – durch die Mikroporenmembran. Anschließend wurden möglichst alle nicht gewanderten Zellen mit Wattestäbchen vorsichtig von der Oberseite der Polycarbonat-Membran entfernt und die migrierten, an der Unterseite haftenden Endothelzellen 5 min mit 5% Formaldehyd in PBS (600 $\mu\text{l}$ /well) fixiert. Nach Waschen mit PBS erfolgte die Anfärbung der migrierten Zellen durch 15-minütiges Eintauchen der *Transwells* in Färbelösung (0,5%ige Kristallviolettlösung in Aqua bidest.). Es folgten mehrere Waschvorgänge mit PBS und Lufttrocknen.

Durch bildliche Dokumentation mittels einer an das Mikroskop sowie an ein Softwareprogramm angeschlossenen Kamera (Desaga ProViDoc) wurde der Migrationsvorgang quantitativ beurteilt. Die qualitative Auswertung erfolgte durch Auszählen der migrierten Zellen unter dem Mikroskop in einem durch die im Mikroskop integrierte Photostrichplatte definierten Bereich von 864 mm<sup>2</sup>.

#### **2.13.4 *In vitro* Angiogenese, “tube formation“**

Die Bildung tubulärer Strukturen durch Endothelzellen, die sogenannte *tube formation*, wurde mit dem *In Vitro* Angiogenesis Assay Kit evaluiert. Es stellt ein vereinfachtes Angiogenesemodell dar, durch welches die Induktion oder die Hemmung der *tube formation* durch exogene Signale ermittelt werden kann. Werden HUVECs auf ECMatrix™ – einem soliden Gel mit Proteinen der Basalmembran, die aus dem murinen Engelbreth Holm-Swarm (EHS)-Tumor isoliert wurden – kultiviert, kommt es rasch zu Zusammenschlüssen von Zellen, die im weiteren Verlauf tubuläre Strukturen bilden.

Nach Herstellung der ECMatrix™ entsprechend der Testanleitung und Aushärtung in 96-Lochplatten wurden HUVECs ausgesät (10<sup>4</sup> Zellen in 100 µl/well) und 1 Stunde inkubiert, um die Adhäsion an die Matrix zu ermöglichen. Dann erfolgte der Zusatz der Behandlungssubstanzen bzw. der konditionierten Medien (100µl/well) und im Anschluss die Inkubation im CO<sub>2</sub>-Brutschrank über Nacht. Die Auswertung erfolgte durch bildliche Dokumentation mittels einer an das Mikroskop und an ein Softwareprogramm angeschlossenen Kamera (Desaga ProViDoc) sowie durch Auszählen der intakten Zell-zu-Zell Verbindungen (*tubes*) unter dem Mikroskop in einem definierten Bereich von 864 mm<sup>2</sup>.

### **2.14 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.

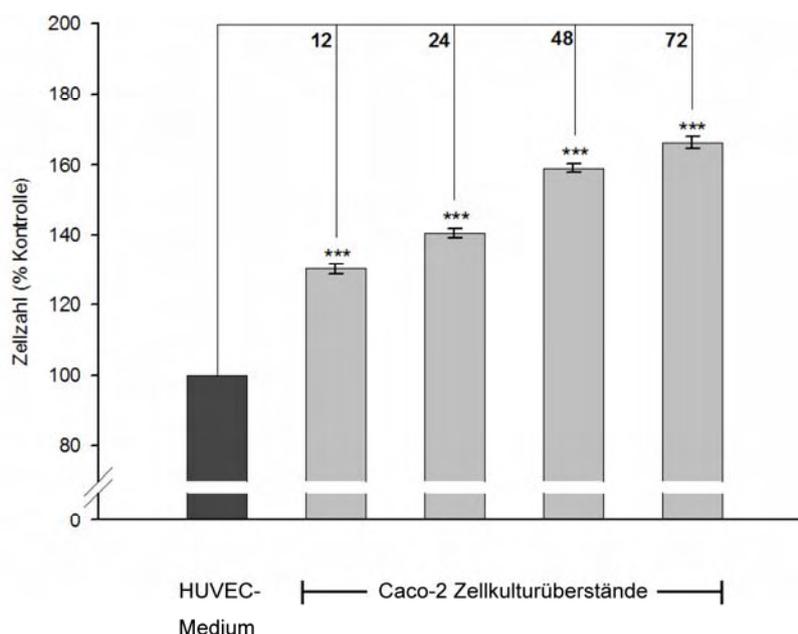
### 3 ERGEBNISSE

Dieser Teil der Arbeit dient der Darstellung und Erläuterung der Versuchsergebnisse. Zunächst wird gezeigt, welchen Einfluss die Histondeacetylase (HDAC) - Inhibitoren Valproat, Butyrat und Trichostatin A auf verschiedene angiogeneserelevante Zellfunktionen von Endothelzellen – hier am Beispiel der Endothelzelllinie *human umbilical vein endothelial cell* (HUVEC) – ausüben. Nächstes Ziel dieser Arbeit war es, die Wirkung der eingesetzten Behandlungssubstanzen auf die Expression bzw. Sekretion der Wachstumsfaktoren *basic fibroblast growth factor* (FGF-2) und *vascular endothelial growth factor* (VEGF) in der humanen Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 zu untersuchen. Der dritte Teil beschäftigt sich mit den Mechanismen, die der Regulation dieser Faktoren möglicherweise zugrundeliegen. Hierbei wird auf die Expression und Aktivität des Transkriptionsfaktors *hypoxia inducible factor-1 $\alpha$*  (HIF-1 $\alpha$ ) sowie auf Signalmoleküle des PI3-Kinase/AKT-Signaltransduktionsweges eingegangen.

#### 3.1 Zellzahl von HUVECs

Wie in Kap. 1.2.1 beschrieben, ist die Produktion proangiogener Faktoren durch Tumorzellen ein entscheidender Schritt im Angiogeneseprozess. Diffundieren diese Signalmoleküle zu Endothelzellen benachbarten Gefäße, werden die Endothelzellen im weiteren Verlauf aktiviert und u.a. zur Proliferation angeregt. Um diesen Prozess für die eingesetzte Kolonkarzinomzelllinie *in vitro* zu verifizieren, wurde vor der eigentlichen Arbeit mit den verschiedenen Behandlungssubstanzen zunächst untersucht, welchen Einfluss Zellkulturüberstände unbehandelter Caco-2 Zellen auf die zahlenmäßige Entwicklung von Endothelzellen ausüben.

Hierzu wurden Caco-2 Zellen zunächst unter Standardbedingungen inkubiert. Nach 12, 24, 48 und 72 Stunden wurde jeweils der Zellkulturüberstand abgenommen. Anschließend wurden subkonfluente HUVECs mit diesen Zellkulturüberständen bzw. mit HUVEC-Standardkulturmedium als Kontrolle inkubiert. Nach 48 Stunden Inkubationsdauer wurde die Zellzahl der HUVECs mittels Kristallviolett färbung bestimmt.



**Abbildung 3.1** Zellzahl von HUVECs nach 48-stündiger Inkubation mit Zellkulturüberständen unbehandelter Caco-2 Zellen (gewonnen nach 12, 24, 48 bzw. 72 Stunden), n=6 für alle Gruppen.

Wie aus **Abbildung 3.1** ersichtlich, führte die Inkubation von HUVECs mit Zellkulturüberständen unbehandelter Caco-2 Zellen zu einer – zu allen gemessenen Zeitpunkten hochsignifikanten ( $p < 0,001$ ) – Zunahme der Zellzahl im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. Das Ausmaß der Steigerung war dabei abhängig von der vorangegangenen Inkubationsdauer der Caco-2 Zellen. Der nach 12 Stunden gewonnene Zellkulturüberstand induzierte bereits eine Zunahme der Endothelzellzahl um ca. 30% im Vergleich zur Kontrolle. Nach 24-stündiger Inkubation entnommener Caco-2 Überstand führte zu einer Erhöhung der Zellzahl um ca. 41%. Nach 48 Stunden Inkubation gewonnener Überstand induzierte eine Zunahme der Zellzahl um ca. 60%. Caco-2 Zellkulturüberstand, der nach 72-stündiger Inkubation entnommen wurde, steigerte die Zellzahl der HUVECs um ca. 66% im Vergleich zur Kontrolle.

## 3.2 Einfluss von Valproat, Butyrat und Trichostatin A auf Proliferation, Migration und *in vitro* Angiogenese von HUVECs

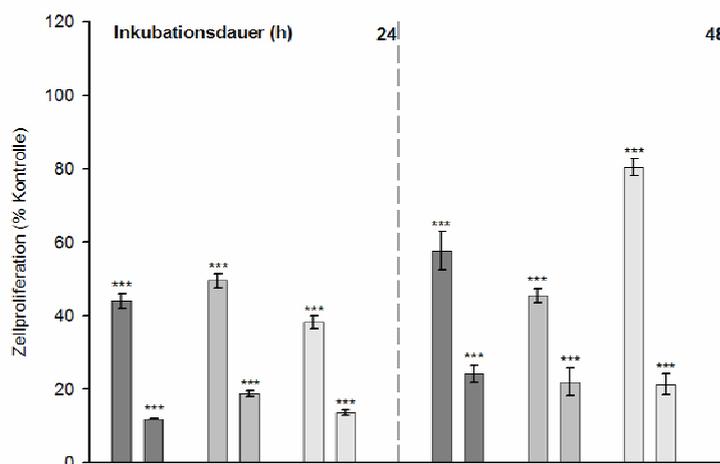
Die Tumorangiogenese ist ein multifaktorieller Prozess, für den die normale Funktion von Endothelzellen unentbehrlich ist. Die Hemmung verschiedener in den Angiogeneseprozess involvierter endothelialer Zellfunktionen gewinnt daher zunehmend an Bedeutung. Gegenstand aktueller Forschung ist das mögliche antiangiogene Potential von HDAC-Inhibitoren (s. Kap. 1.3.3). Anhand verschiedener *in vitro* Modelle wurde der Einfluss der HDAC-Inhibitoren Valproat, Butyrat und Trichostatin A auf die Proliferation, die Migration sowie die *in vitro* Angiogenese von HUVECs untersucht. Neben dem direkten Einfluss der Behandlungssubstanzen war auch deren sekundäre Wirkung – über die Beeinflussung der Synthese pro- und/oder antiangiogener Faktoren – auf Endothelzellen von Interesse: in einer weiteren Versuchsreihe wurde ermittelt, wie Zellkulturüberstände von Caco-2 Zellen, die zuvor mit Valproat, Butyrat oder Trichostatin A inkubiert wurden, auf die Proliferation, die Migration sowie die *in vitro* Angiogenese von HUVECs wirken.

### 3.2.1 Zellproliferation von HUVECs

Da die Proliferationsfähigkeit von Endothelzellen eine Voraussetzung für den Angiogeneseprozess darstellt, wurde zunächst untersucht, welchen Einfluss verschiedene HDAC-Inhibitoren auf die mitogene Aktivität von HUVECs ausüben.

Hierzu wurden HUVECs 24 Stunden nach der Aussaat für weitere 24 bzw. 48 Stunden mit Standardmedium oder Medium supplementiert mit Valproat [1 mM, 3 mM], Butyrat [1 mM, 3 mM] oder Trichostatin A [100 nM, 400 nM] inkubiert. Anschließend wurde die Proliferationsrate der Endothelzellen anhand eines Zellproliferationskits (BrdU-ELISA) ermittelt.

Wie aus **Abbildung 3.2** ersichtlich, führte die Inkubation mit allen drei Behandlungssubstanzen zu einer jeweils hochsignifikanten ( $p < 0,001$ ) und konzentrations-abhängigen Abnahme der Zellproliferation im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. Nach 24 Stunden sank der Einbau von BrdU in mit Valproat [1 mM] behandelten Zellen auf ca. 44% der Kontrolle, nach 48 Stunden auf ca. 58% der Kontrolle. Durch die Inkubation mit Valproat [3 mM] wurde die Zellproliferation nach 24 Stunden auf ca. 12% der Kontrolle, nach 48 Stunden auf ca. 24% der Kontrolle reduziert.

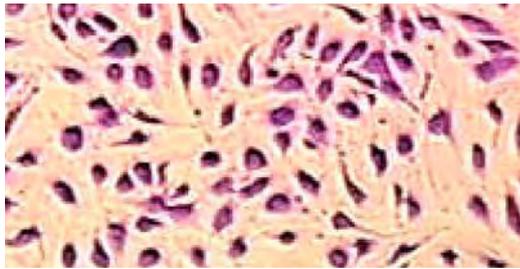


|                            |   |   |   |   |     |     |   |   |   |   |     |     |
|----------------------------|---|---|---|---|-----|-----|---|---|---|---|-----|-----|
| <b>Valproat A [mM]</b>     | 1 | 3 | - | - | -   | -   | 1 | 3 | - | - | -   | -   |
| <b>Butyrat [mM]</b>        | - | - | 1 | 3 | -   | -   | - | - | 1 | 3 | -   | -   |
| <b>Trichostatin A [nM]</b> | - | - | - | - | 100 | 400 | - | - | - | - | 100 | 400 |

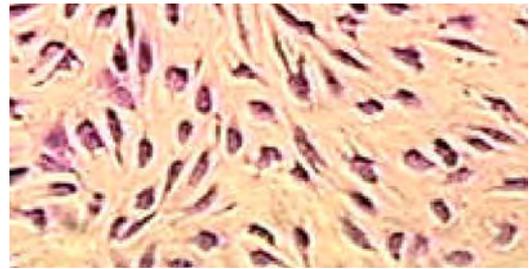
**Abbildung 3.2** Zellproliferation von HUVECs nach 24- bzw. 48-stündiger Inkubation mit Valproat [1 mM, 3 mM], Butyrat [1 mM, 3 mM] oder Trichostatin A [100 nM, 400 nM]. Die Ergebnisse sind in Prozent der jeweiligen Kontrolle, die auf 100% gesetzt wurde, angegeben (n=8).

Die Inkubation mit Butyrat [1 mM] führte nach 24 Stunden zu einer Abnahme der Zellproliferation auf ca. 49% der Kontrolle, nach 48 Stunden auf ca. 46% der Kontrollwerte. Die Inkubation mit Butyrat [3 mM] resultierte in einer Abnahme der Proliferation auf ca. 19% der Kontrolle nach 24 Stunden bzw. auf ca. 22% nach 48 Stunden.

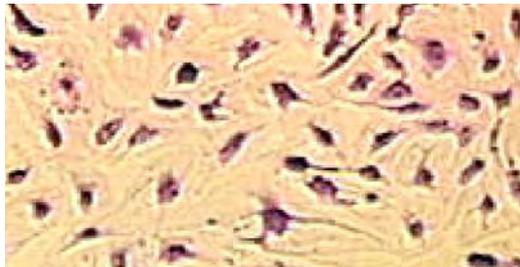
Der Einbau von BrdU in mit Trichostatin A [100 nM] behandelten Zellen sank nach 24 Stunden auf ca. 38% der Kontrolle bzw. nach 48 Stunden auf ca. 80% der Kontrolle. Die Inkubation mit Trichostatin A [400 nM] führte nach 24 Stunden zu einer Abnahme der Zellproliferation auf ca. 14% der Kontrolle. Nach 48 Stunden war die Zellproliferation auf ca. 21% der Kontrollwerte reduziert.



Kontrolle



Valproat [3 mM]



Butyrat [3 mM]



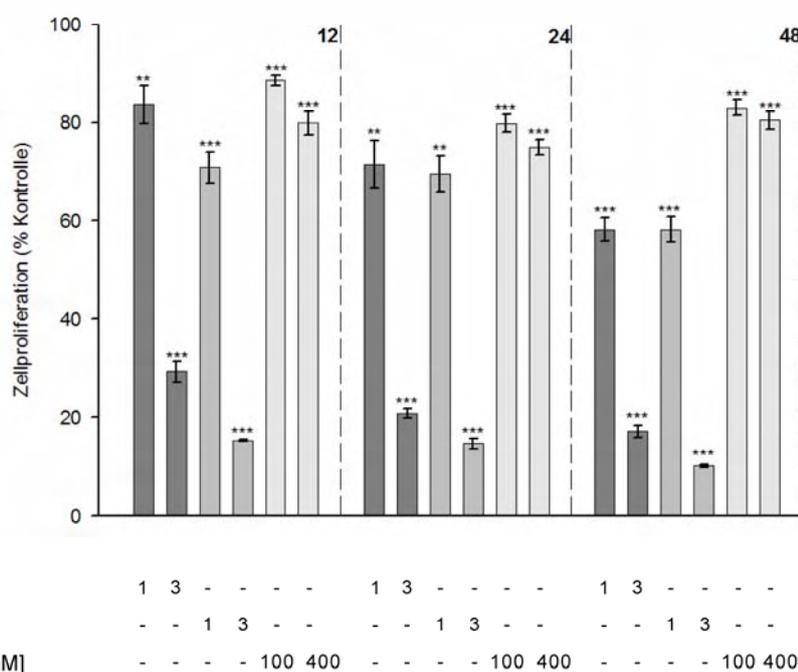
Trichostatin A [400 nM]

**Abbildung 3.3** HUVECs nach 48-stündiger Inkubation mit Valproat [3 mM], Butyrat [3 mM] oder Trichostatin A [400 nM] (500fache Vergrößerung)

Der Einfluss der eingesetzten Behandlungssubstanzen auf die Zellproliferation wurde zusätzlich bildlich dokumentiert: **Abbildung 3.3** veranschaulicht die morphologische Entwicklung der HUVECs nach 48 Stunden Inkubation mit Standardmedium oder Medium supplementiert mit Valproat [3 mM], Butyrat [3 mM] oder Trichostatin A [400 nM].

Im Folgenden war von Interesse, welchen Einfluss die Zellkulturüberstände entsprechend behandelter Caco-2 Zellen auf die endotheliale Proliferationsfähigkeit ausüben.

Hierzu wurden HUVECs 24 Stunden nach der Aussaat für weitere 24 Stunden mit konditionierten Caco-2 Medien inkubiert. Verwendet wurden die Zellkulturüberstände von Caco-2 Zellen, die zuvor 12, 24 bzw. 48 Stunden mit Valproat [1 mM, 3 mM], Butyrat [1 mM, 3 mM] oder Trichostatin A [100 nM, 400 nM] inkubiert wurden. Als Kontrolle diente jeweils der Zellkulturüberstand unbehandelter Caco-2 Zellen. Die Proliferationsrate der Endothelzellen wurde anhand eines Zellproliferationskits (BrdU-ELISA) bestimmt.



**Abbildung 3.4** Zellproliferation von HUVECs nach 24-stündiger Inkubation mit konditionierten Caco-2 Medien. Die Zellkulturüberstände stammen von Caco-2 Zellen, die zuvor für die Dauer von 12, 24 bzw. 48 Stunden mit Valproat [1 mM, 3 mM], Butyrat [1 mM, 3 mM] oder Trichostatin A [100 nM, 400 nM] behandelt wurden. Die Ergebnisse sind in Prozent der jeweiligen Kontrolle, die auf 100% gesetzt wurde, angegeben (n=6).

Wie aus **Abbildung 3.4** ersichtlich, führte die Inkubation mit allen konditionierten Caco-2 Medien zu einer jeweils hochsignifikanten ( $p < 0,01$  bzw.  $p < 0,001$ ) sowie zeit- und konzentrationsabhängigen Abnahme der Zellproliferationsrate der HUVECs im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle.

Valproat [1 mM] - konditioniertes Medium, das nach 12 Stunden Inkubation entnommen wurde, führte bereits zu einer Reduktion der Zellproliferation auf ca. 84% der Kontrolle. Nach 24 Stunden bzw. nach 48 Stunden gewonnenes Medium reduzierte sie weiter auf ca. 72% bzw. auf ca. 58% der Kontrolle. Eine deutliche Tendenz zeigte sich auch bei Inkubation der HUVECs mit Valproat [3 mM] - konditioniertem Medium. Nach 12 Stunden Inkubation entnommener Caco-2 Zellkulturüberstand reduzierte die endotheliale Proliferation auf ca. 29% der Kontrolle. Nach 24 Stunden bzw. 48 Stunden gewonnener Überstand reduzierte sie weiter auf ca. 21% bzw. auf ca. 17% der Kontrolle.

Die Proliferation der HUVECs, die mit Butyrat [1 mM] - konditioniertem Medium behandelt wurden, sank ebenfalls abhängig vom Zeitpunkt der Überstand-Gewinnung. Nach 12 Stunden

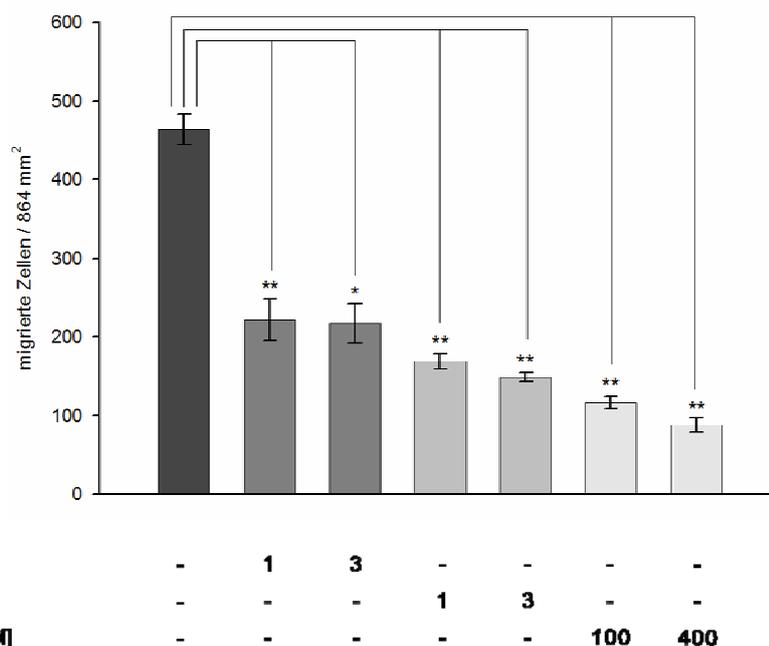
Inkubation gewonnener Caco-2 Überstand reduzierte den Einbau von BrdU in Endothelzellen bereits auf ca. 71% der Kontrolle. Der nach 24 Stunden Inkubation entnommene Zellkulturüberstand reduzierte die endotheliale Proliferation auf ca. 70%, nach 48 Stunden entnommene Medium verringerte sie weiter auf ca. 58% der Kontrolle. Die Caco-2 Überstände, die nach Inkubation mit Butyrat [3 mM] gewonnen wurden, führten zu einer Abnahme der Zellproliferation auf jeweils ca. 15% der Kontrolle nach 12 bzw. 24 Stunden und auf ca. 10% der Kontrolle nach 48 Stunden.

Trichostatin A [100 nM] - konditioniertes Medium, welches nach 12 Stunden Inkubation entnommen wurde, führte zu einer Abnahme der Zellproliferation auf ca. 89% der Kontrolle. Nach 24 Stunden bzw. nach 48 Stunden gewonnenes Medium reduzierte sie auf ca. 80% bzw. auf ca. 83% der Kontrolle. Zellkulturüberstand, der nach 12 Stunden Inkubation der Caco-2 Zellen mit Trichostatin A [400 nM] entnommen wurde, reduzierte die Proliferation der HUVECs auf ca. 80% der Kontrolle. Die Inkubation der Endothelzellen mit Medium, das nach 24 Stunden gewonnen wurde, reduzierte die Proliferation auf ca. 75% der Kontrolle. Nach 48 Stunden entnommener Caco-2 Überstand führte zu einer Abnahme des BrdU-Einbaus in HUVECs auf ca. 80%.

### 3.2.2 Migration von HUVECs

Ohne die gerichtete Wanderung von Endothelzellen in Richtung eines angiogenen Stimulus kann keine Angiogenese stattfinden [62]. In einem weiteren *in vitro* Modell wurde daher der Einfluss der HDAC-Inhibitoren Valproat, Butyrat und Trichostatin A auf die Migration von Endothelzellen untersucht.

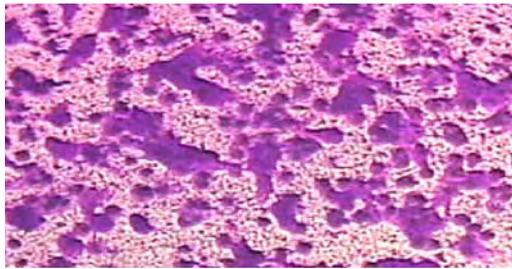
Hierzu wurden HUVECs zur Migration durch die Mikroporen einer Polycarbonat-Membran angeregt (Abbildung des Versuchsaufbaus s. Kap. 2.13.3). Durch Zusatz von Valproat [1 mM, 3 mM], Butyrat [1 mM, 3 mM] oder Trichostatin A [100 nM, 400 nM] in die untere Probenkammer wurde die mögliche Migrationshemmung durch diese Substanzen untersucht. Nach 5-stündiger Inkubation wurde die Wanderung der Endothelzellen durch Auszählen der migrierten Zellen in einem Bereich von 864 mm<sup>2</sup> evaluiert. Zusätzlich wurden die Effekte von Valproat [3 mM], Butyrat [3 mM] und Trichostatin A [400 nM] auf die Migration der Endothelzellen bildlich dokumentiert.



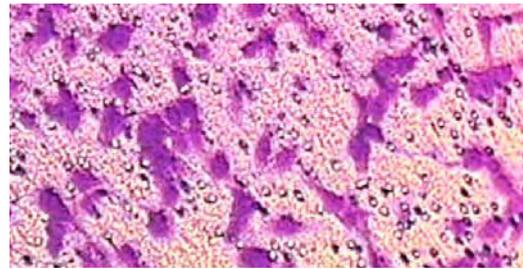
**Abbildung 3.5** Migration von HUVECs durch eine Polycarbonat-Membran nach 5 Stunden Inkubationszeit. Untere Probenkammer supplementiert mit Valproat [1 mM, 3 mM], Butyrat [1 mM, 3 mM] oder Trichostatin A [100 nM, 400 nM]. Repräsentativ ist einer von drei unabhängigen Migrationsversuchen graphisch dargestellt (n=3).

Wie aus **Abbildung 3.5** ersichtlich, führte die Inkubation mit Valproat, Butyrat und Trichostatin A zu einer jeweils konzentrationsabhängigen Abnahme der Migrationsrate. Valproat [1 mM] reduzierte die Zahl der gewanderten Zellen mit  $222 \pm 45$  auf ca. 48% im Vergleich zu den Kontrollwerten ( $464 \pm 34$  Zellen pro  $864 \text{ mm}^2$ ). Ähnlich wirkte Valproat [3 mM] mit einer Abnahme auf etwa  $217 \pm 44$  Zellen (ca. 47%). Mit Butyrat [1 mM] in der unteren Probenkammer wurde die Zahl der migrierten Zellen mit  $169 \pm 17$  auf ca. 36%, mit Butyrat [3 mM] auf ca. 32% ( $149 \pm 9$  Zellen) der Kontrolle reduziert. Durch Trichostatin A [100 nM] wurde die Polycarbonat-Membran von  $117 \pm 14$  Zellen pro  $864 \text{ mm}^2$  penetriert (Reduktion auf ca. 25%). Trichostatin A [400 nM] verringerte die Zahl der gewanderten Zellen auf ca. 19% ( $88 \pm 16$  vs.  $464 \pm 34$  Zellen).

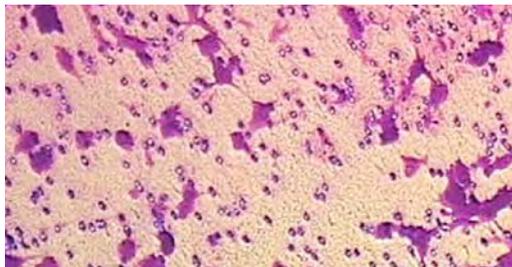
In **Abbildung 3.6** ist die Abnahme der Migrationsrate durch Supplementierung des Kulturmediums in der unteren Probenkammer mit Valproat [3 mM], Butyrat [3 mM] und Trichostatin A [400 nM] deutlich zu erkennen.



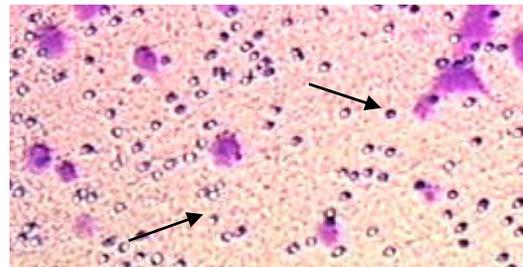
Kontrolle



Valproat [3 mM]



Butyrat [3 mM]

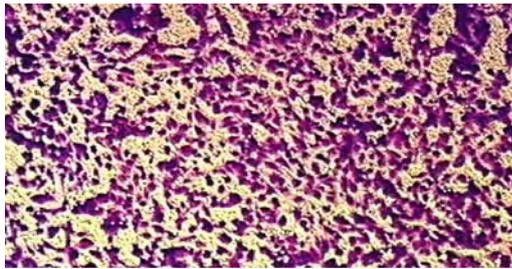


Trichostatin A [400 nM]

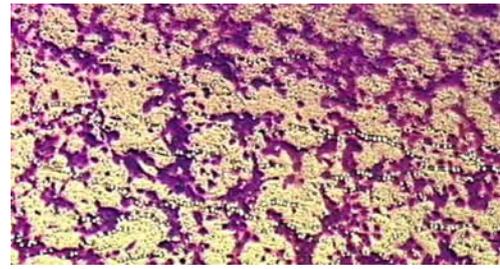
**Abbildung 3.6** Migration von HUVECs durch eine Polycarbonat-Membran nach 5 Stunden Inkubationszeit. Untere Probenkammer supplementiert mit Valproat [3 mM], Butyrat [3 mM] oder Trichostatin A [400 nM]. Bei den mit Pfeilen gekennzeichneten Strukturen handelt es sich um an der Oberseite der Membran haftende, nicht migrierte Zellen (500fache Vergrößerung).

Neben dem direkten Einfluss der Substanzen wurde auch hier der Einfluss der Zellkulturüberstände behandelte Caco-2 Zellen auf die endotheliale Migrationsfähigkeit untersucht.

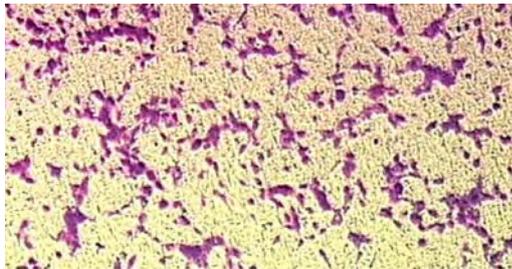
Bei dieser Versuchsdurchführung wurden konditionierte Caco-2 Medien in die untere Probenkammer gegeben. Verwendet wurden die Zellkulturüberstände von Caco-2 Zellen, die zuvor 24 Stunden mit Valproat [3 mM], Butyrat [3 mM] oder Trichostatin A [400 nM] inkubiert wurden. Als Kontrollmedium diente der Zellkulturüberstand unbehandelter Caco-2 Zellen. Nach 5-stündiger Inkubation wurde die Wanderung der Endothelzellen durch die Poren der Polycarbonat-Membran bildlich dokumentiert (s. **Abb. 3.7**).



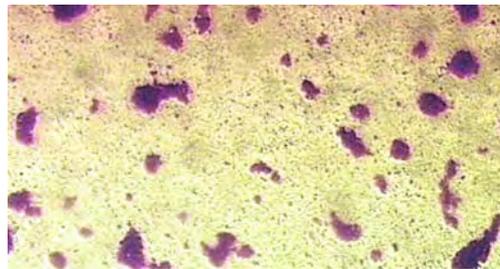
Kontrolle



Valproat [3 mM]



Butyrat [3 mM]



Trichostatin A [400 nM]

**Abbildung 3.7** Migration von HUVECs durch eine Polycarbonat-Membran nach 5 Stunden Inkubationszeit. Die untere Probenkammer enthielt Zellkulturüberstände von Caco-2 Zellen, die zuvor 24 Stunden mit Valproat [3 mM], Butyrat [3 mM] (120fache Vergrößerung) oder Trichostatin A [400 nM] behandelt wurden (500fache Vergrößerung).

### 3.2.3 *In vitro* Angiogenese von HUVECs

Die eingesetzten Behandlungssubstanzen erwiesen sich in den bisher beschriebenen Versuchen als potente Hemmstoffe angiogeneserelevanter Zellfunktionen. Neben der Proliferations- und Migrationsfähigkeit von Endothelzellen stellt die Ausbildung tubulärer Strukturen, die sog. *tube formation*, einen weiteren essentiellen Schritt im Angiogenese-prozess dar. Erst durch die Entwicklung eines – wenn auch zunächst primitiven – Gefäßnetzwerkes ist die Voraussetzung für den Aufbau einer Blutzirkulation gegeben (s. Kap. 1.2.1.2). Im Folgenden wurde mittels eines vereinfachten Angiogenesemodells untersucht, welchen Einfluss Valproat, Butyrat und Trichostatin A auf die *in vitro* Angiogenese von HUVECs ausüben.

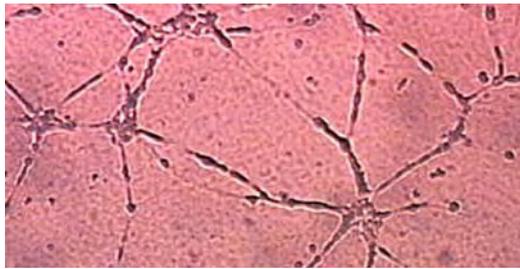
Nach Adhäsion der HUVECs an eine entsprechend der Versuchsanleitung hergestellte ECMatrix™ folgte über Nacht eine Inkubationsphase mit Standardnährmedium oder Medium supplementiert mit Valproat [3 mM], Butyrat [3 mM] oder Trichostatin A [400 nM]. Anschließend wurde die Ausbildung tubulärer Strukturen durch Auszählen der intakten Zell-

zu-Zell Verbindungen (*tubes*) in einem Bereich von 864 mm<sup>2</sup> quantitativ ausgewertet. Zur Veranschaulichung wurden die strukturellen Veränderungen der Endothelzellen zusätzlich bildlich dokumentiert.

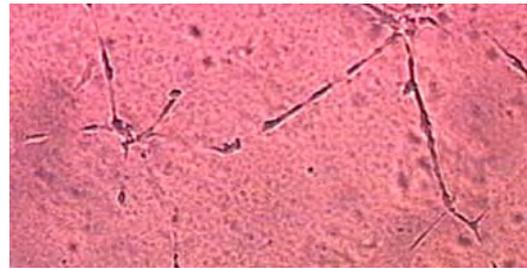
Wie die mikroskopischen Aufnahmen zeigen, führte die Inkubation der HUVECs mit allen eingesetzten Behandlungssubstanzen zu einer Abnahme der *tube formation* (**Abbildung 3.8**). Die quantitative Auswertung ergab eine z.T. signifikante bzw. hochsignifikante ( $p < 0,05$  bzw.  $p < 0,01$ ) Reduktion der intakten Zell-zu-Zell Verbindungen. Durch die Inkubation mit Valproat [3 mM] wurde die Ausbildung der tubulären Strukturen mit  $51 \pm 3$  *tubes* auf ca. 80% der Kontrollwerte (ca.  $64 \pm 4$  *tubes*) reduziert. Butyrat [3 mM] bewirkte eine Abnahme der kapillarähnlichen Formationen auf ca. 67% ( $43 \pm 9$  *tubes*). Die Inkubation mit Trichostatin A [400 nM] führte zu einer Abnahme der intakten Zell-zu-Zell Verbindungen auf 45% ( $29 \pm 5$  vs.  $64 \pm 4$  pro 864 mm<sup>2</sup>). (n=3, ohne Abbildung).

Anschließend galt auch hier zu untersuchen, inwieweit konditionierte Medien kultivierter Caco-2 Zellen die *in vitro* Angiogenese von HUVECs beeinflussen. Nach entsprechender Adhäsion der HUVECs an eine ECMatrix™ folgte eine Inkubationsphase über Nacht – in diesem Fall mit Zellkulturüberständen von Caco-2 Zellen, die zuvor für die Dauer von 48 Stunden mit Valproat [3 mM], Butyrat [3 mM] oder Trichostatin A [400 nM] behandelt wurden. Als Kontrollmedium wurde der Zellkulturüberstand unbehandelter Caco-2 Zellen eingesetzt.

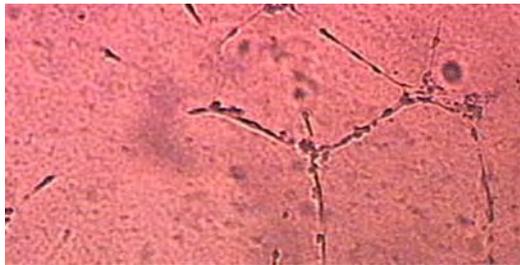
Wie aus **Abbildung 3.9** ersichtlich, führte die Inkubation der HUVECs mit konditionierten Caco-2 Medien zu einer Inhibierung der *tube formation*. Es finden sich weniger intakte Zell-zu-Zell Verbindungen (*tubes*) im Vergleich zur Kontrolle, wobei die Effekte im Vergleich zum vorhergehenden Versuch (s. **Abb. 3.7**) hier weniger deutlich sind. (n=3).



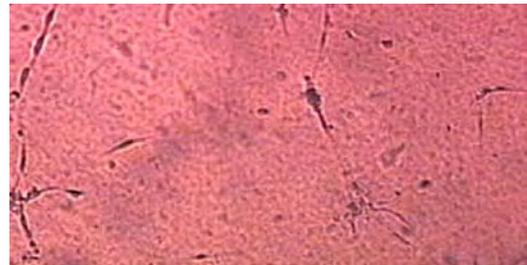
Kontrolle



Valproat [3 mM]

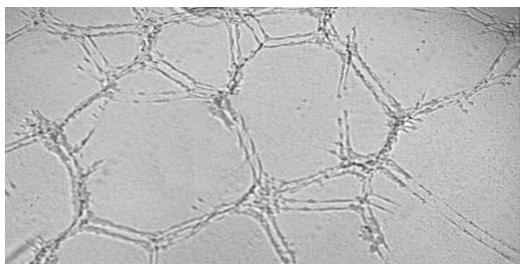


Butyrat [3 mM]

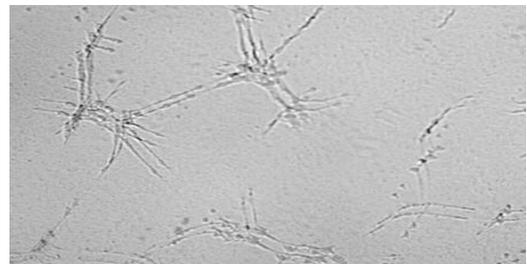


Trichostatin A [400 nM]

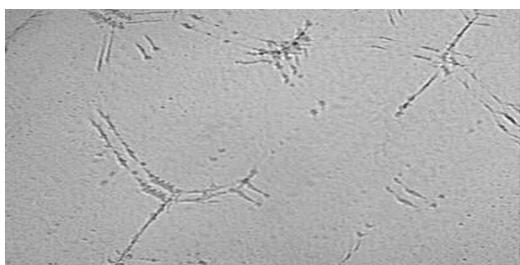
**Abbildung 3.8** *In vitro* Angiogenese von HUVECs nach Inkubation mit Valproat [3 mM], Butyrat [3 mM] oder Trichostatin A [400 nM] über Nacht (500fache Vergrößerung)



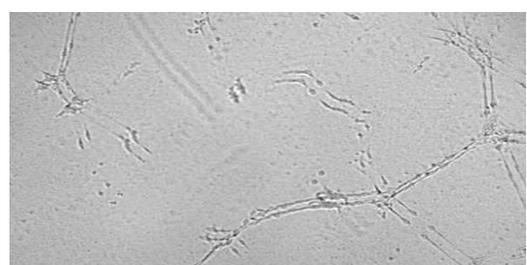
Kontrolle



Valproat [3 mM]



Butyrat [3 mM]



Trichostatin A [400 nM]

**Abbildung 3.9** *In vitro* Angiogenese von HUVECs nach über-Nacht-Inkubation mit Zellkulturüberständen von Caco-2 Zellen, die zuvor 48 Stunden mit Valproat [3 mM], Butyrat [3 mM] oder Trichostatin A [400 nM] behandelt wurden (500fache Vergrößerung)

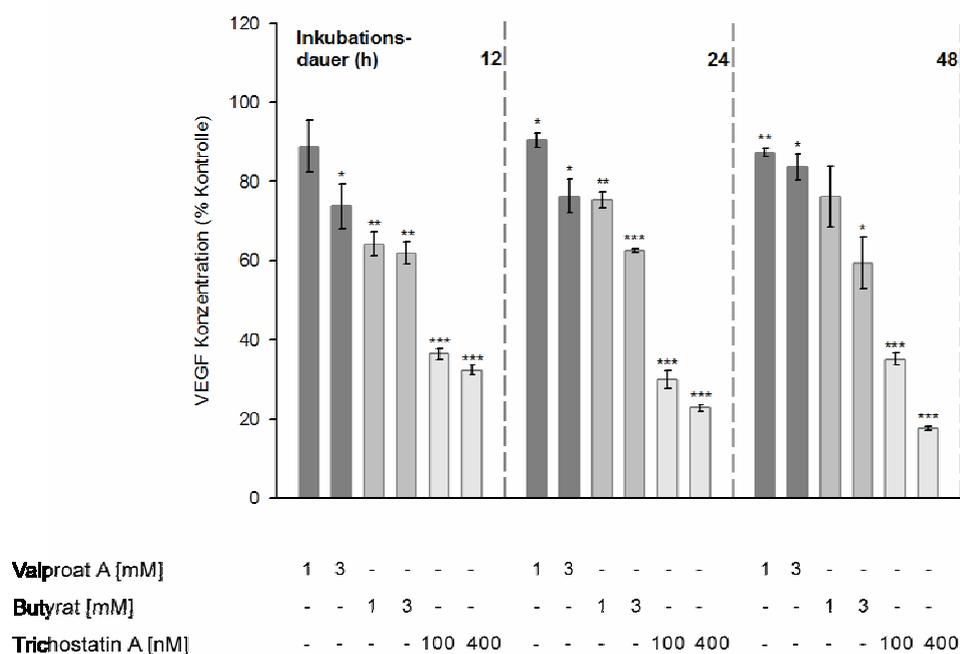
### 3.3 Einfluss von Valproat, Butyrat und Trichostatin A auf die Synthese von VEGF und FGF-2 in Caco-2 Zellen

Wachstumsfaktoren sind maßgeblich am *angiogenic switch* während der tumorinduzierten Angiogenese beteiligt. Eine bedeutende Rolle in diesem Zusammenhang spielt der *vascular endothelial growth factor* (VEGF). Dieses endothelspezifische Signalmolekül wird von Tumorzellen sowohl exprimiert als auch sezerniert. Daneben trägt auch der *basic fibroblast growth factor* (FGF-2) zur Tumorprogression bei. Er wirkt u.a. wachstumsfördernd auf Tumor- und Endothelzellen. FGF-2 wird von der produzierenden Zelle nicht sezerniert (s. Kap. 1.2.2). Es mehren sich die Hinweise darauf, dass HDAC-Inhibitoren verschiedene proangiogene Moleküle modulieren und so indirekt angiogene Prozesse beeinflussen können (s. Kap. 1.3.3). In diesem Zusammenhang war von Interesse, wie Valproat, Butyrat und Trichostatin A die Sekretion bzw. Expression dieser Signalmoleküle in Caco-2 Zellen beeinflussen.

#### 3.3.1 Sekretion von VEGF

Zunächst wurde der Einfluss der hier eingesetzten HDAC-Inhibitoren auf die Sekretion des *vascular endothelial growth factors* (VEGF) durch Caco-2 Zellen untersucht. Hierzu wurden subkonfluente Caco-2 Zellen mit Standardmedium bzw. Medium supplementiert mit Valproat [1 mM, 3 mM], Butyrat [1 mM, 3 mM] oder Trichostatin A [100 nM, 400 nM] inkubiert. Nach 12, 24 und 48 Stunden Inkubationsdauer wurde die VEGF Sekretion in den Zellkulturüberständen mittels ELISA bestimmt.

Wie aus **Abbildung 3.10** ersichtlich, resultierte die Behandlung mit allen verwendeten Substanzen in einer konzentrationsabhängigen Abnahme der VEGF Sekretion. Durch Inkubation mit Valproat [1 mM] kam es teilweise zu einer signifikanten bzw. hochsignifikanten Reduktion der VEGF Sekretion im Vergleich zu den unbehandelten Zellen (nach 12 Stunden: Abnahme um ca. 11%, 24 Stunden: - ca. 10%, 48 Stunden: - ca. 13%). Die Inkubation mit Valproat [3 mM] resultierte in einer jeweils signifikanten Abnahme der Sekretion (nach 12 Stunden: Reduktion um ca. 26%, 24 Stunden: - ca. 24%, 48 Stunden: - ca. 16%). Butyrat führte in beiden Konzentrationen zu einer jeweils hochsignifikanten Abnahme der VEGF Sekretion nach 12 Stunden (Butyrat [1 mM]: - ca. 36%, Butyrat [3 mM]: - ca. 38%).

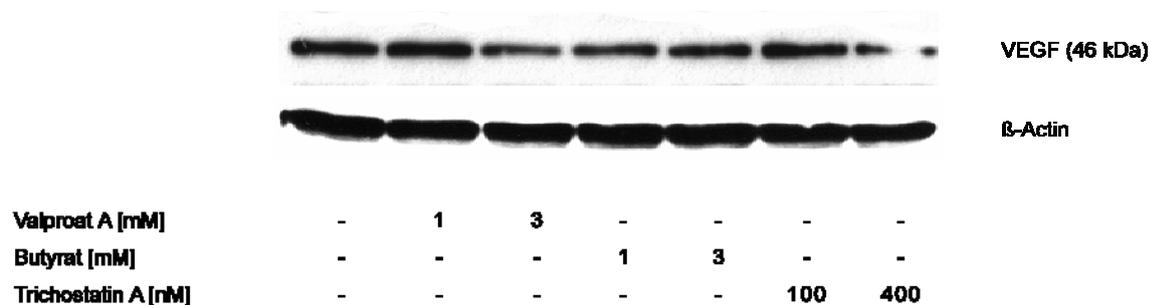


**Abbildung 3.10** VEGF Konzentration im Zellkulturüberstand von Caco-2 Zellen nach 12-, 24- und 48-stündiger Inkubation mit Valproat [1 mM, 3 mM], Butyrat [1 mM, 3 mM] oder Trichostatin A [100 nM, 400 nM]. Die Ergebnisse sind in Prozent der jeweiligen Kontrolle, die auf 100% gesetzt wurde, angegeben (n=4).

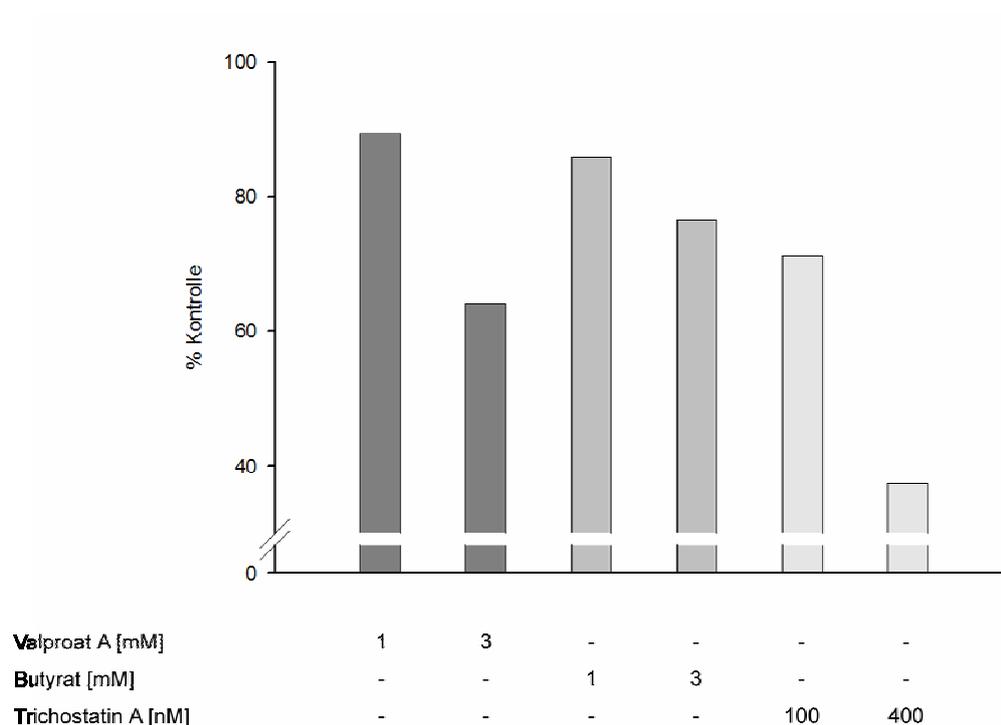
Hochsignifikante Resultate waren ebenso nach 24 Stunden zu beobachten (Butyrat [1 mM]: - ca. 25%, Butyrat [3 mM]: - ca. 37%). Nach 48 Stunden war diese nur teilweise signifikant (Butyrat [1 mM]: - ca. 24%, Butyrat [3 mM]: - ca. 41%). Durch die Inkubation mit Trichostatin A [100 nM, 400 nM] kam es bei beiden Konzentrationen und zu allen gemessenen Zeitpunkten zu einer hochsignifikanten Abnahme der VEGF Sekretion im Vergleich zur Kontrolle (TSA [100 nM]: nach 12 Stunden: Reduktion um ca. 64%, 24 Stunden: - ca. 70%, 48 Stunden: - ca. 65%; TSA [400 nM]: 12 Stunden: - ca. 68%, 24 Stunden: - ca. 77%, 48 Stunden: - ca. 82%).

### 3.3.2 Proteinexpression von VEGF

Aufgrund der z.T. signifikanten Hemmung der VEGF Sekretion durch die eingesetzten Behandlungssubstanzen wurde im Folgenden ihr Einfluss auf die Expression dieses Wachstumsfaktors auf Proteinebene untersucht.



**Abbildung 3.11a** Western Blot des VEGF Proteins im Gesamthomogenat der Caco-2 Zellen nach 72-stündiger Inkubation mit Valproat [1 mM, 3 mM], Butyrat [1 mM, 3 mM] oder Trichostatin A [100 nM, 400 nM]. Repräsentativ ist einer von drei unabhängigen Western Blots dargestellt.



**Abbildung 3.11b** Quantifizierung des VEGF Proteins im Gesamthomogenat der Caco-2 Zellen nach 72-stündiger Inkubation mit Valproat [1 mM, 3 mM], Butyrat [1 mM, 3 mM] oder Trichostatin A [100 nM, 400 nM]. Der Western Blot aus Abbildung 3.11a wurde densitometrisch ausgewertet und im Verhältnis zu  $\beta$ -Actin quantifiziert.

Subkonfluente Caco-2 Zellen wurden in Standardmedium oder Medium supplementiert mit Valproat [1 mM, 3 mM], Butyrat [1 mM, 3 mM] oder Trichostatin A [100 nM, 400 nM] inkubiert. Nach 48 und 72 Stunden erfolgte die Probengewinnung. Das VEGF Protein wurde mittels eines spezifischen Antikörpers nach der Western Blot-Methode nachgewiesen. Als quantitative Kontrolle gleicher Proteinmengen diente die Bestimmung von  $\beta$ -Actin in den Proben. Die Banden der Western Blots wurden anschließend densitometrisch ausgewertet, im Verhältnis zu  $\beta$ -Actin quantifiziert und die Ergebnisse in Prozent der jeweiligen Kontrolle graphisch dargestellt.

Wie aus der **Abbildung 3.11a** ersichtlich, verminderte die Behandlung der Caco-2 Zellen mit Valproat [1 mM] die Proteinexpression von VEGF nach 72 Stunden nicht merklich. Valproat [3 mM] führte dagegen zu einer deutlichen Abnahme der VEGF Expression. Die Behandlung der Caco-2 Zellen mit Butyrat [1 mM, 3 mM] führte nach 72 Stunden Inkubation zu einer ebenfalls deutlichen Reduktion der VEGF Proteinexpression. Trichostatin A [100 nM, 400 nM] führte konzentrationsabhängig zur stärksten Abnahme der Expression des VEGF Proteins nach 72 Stunden Inkubation.

Die densitometrische Auswertung der Western Blot Banden (**Abbildung 3.11b**) ergab für Valproat [1 mM] eine Abnahme der VEGF Proteinexpression auf 89% der Kontrolle. Valproat [3 mM] reduzierte die VEGF Proteinexpression auf 64% der Kontrolle. Die Inkubation mit Butyrat [1 mM] bzw. Butyrat [3 mM] resultierte in einer Abnahme des VEGF Proteins auf 86% bzw. auf 76% der jeweiligen Kontrolle. Nach Inkubation mit Trichostatin A [100 nM] war nach 72 Stunden eine Reduktion der VEGF Proteinexpression auf 71% der Kontrolle zu beobachten. Trichostatin A [400 nM] führte zu einer Abnahme des VEGF Proteins auf 37% der Kontrolle.

### 3.3.3 VEGF Genexpression

Ergänzend zu den Befunden zur Sekretion und Proteinexpression von VEGF wurde die Wirkung von Valproat, Butyrat und Trichostatin auf die Expression der VEGF mRNA untersucht.

Hierzu wurden subkonfluente Caco-2 Zellen in Standardmedium oder Medium supplementiert mit Valproat [3 mM], Butyrat [3 mM] oder Trichostatin A [100 nM, 200 nM, 400 nM, 800 nM] inkubiert. Nach 24 Stunden erfolgte die Isolation der zellulären RNA. Nach

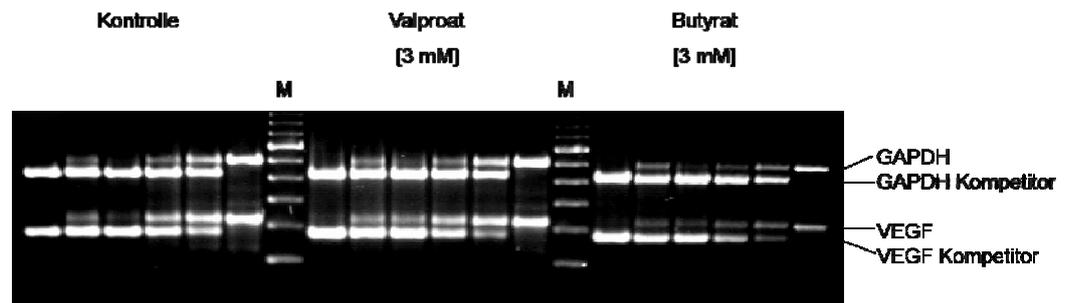
der RT- Reaktion wurde VEGF zusammen mit seinem Kompetitor (1:3 Verdünnungsreihe) mittels RT-kompetitiver Multiplex-PCR amplifiziert. Als Reporter gen diente GAPDH. Nach der densitometrischen Auswertung der Banden wurde die mRNA Expression von VEGF relativ zur mRNA Expression von GAPDH bestimmt.

Wie in **Abbildung 3.12** dargestellt, wurde die VEGF mRNA Expression in Caco-2 Zellen durch Inkubation mit Valproat [3 mM] im Vergleich zu den unbehandelten Zellen deutlich reduziert. Die relative Abnahme im Verhältnis zu GAPDH war mit ca. 56% gegenüber den Kontrollwerten signifikant ( $p < 0,05$ ).

Die Behandlung der Caco-2 Zellen mit Butyrat [3 mM] führte zu einer noch stärkeren Reduktion der VEGF mRNA Expression. Hier kam es zu einer hochsignifikanten ( $p < 0,01$ ) relativen Abnahme auf ca. 43% der Kontrollwerte.

**Abbildung 3.13** ist zu entnehmen, dass die VEGF mRNA Expression in Caco-2 Zellen durch Inkubation mit Trichostatin A im Vergleich zu den unbehandelten Zellen deutlich und konzentrationsabhängig reduziert wurde. Nach Inkubation mit Trichostatin A [100 nM] war die relative Abnahme im Verhältnis zu GAPDH mit ca. 73% gegenüber den Kontrollwerten signifikant ( $p < 0,05$ ). Mit Trichostatin A [200 nM] wurde eine ebenfalls signifikante Reduktion auf ca. 53% erzielt ( $p < 0,05$ ). Die Behandlung der Caco-2 Zellen mit Trichostatin A [400 nM] führte zu einer noch stärkeren Reduktion der VEGF mRNA Expression. Hier kam es zu einer hochsignifikanten ( $p < 0,01$ ) relativen Abnahme auf ca. 47% der Kontrollwerte. Die Inkubation mit Trichostatin A [800 nM] ergab eine signifikante Reduktion der VEGF mRNA auf ca. 35% ( $p < 0,05$ ).

A



B

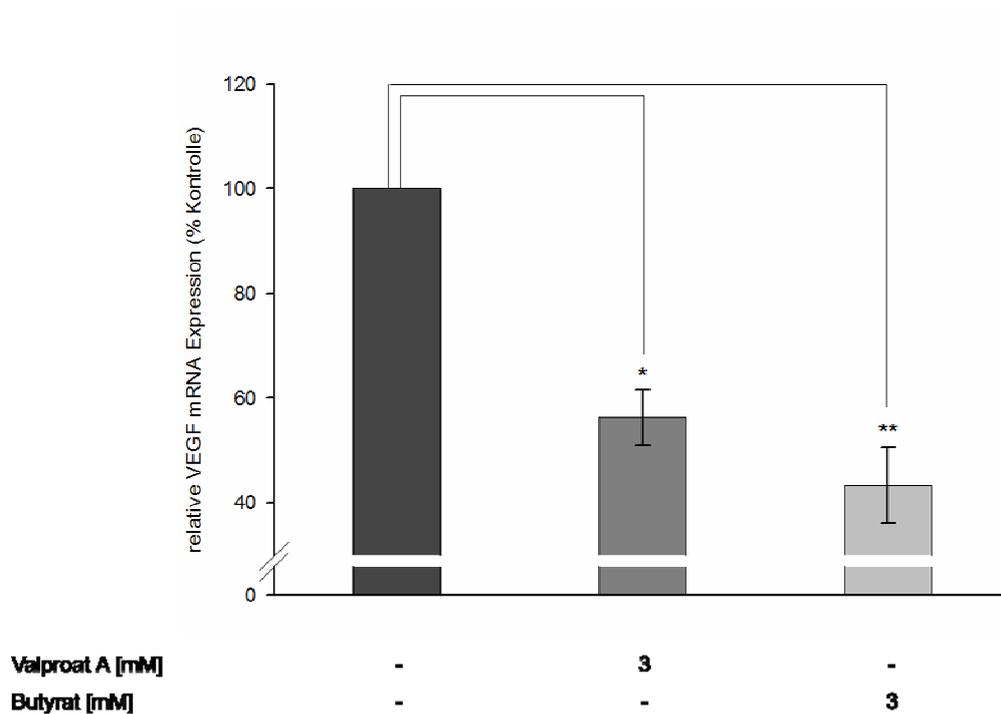
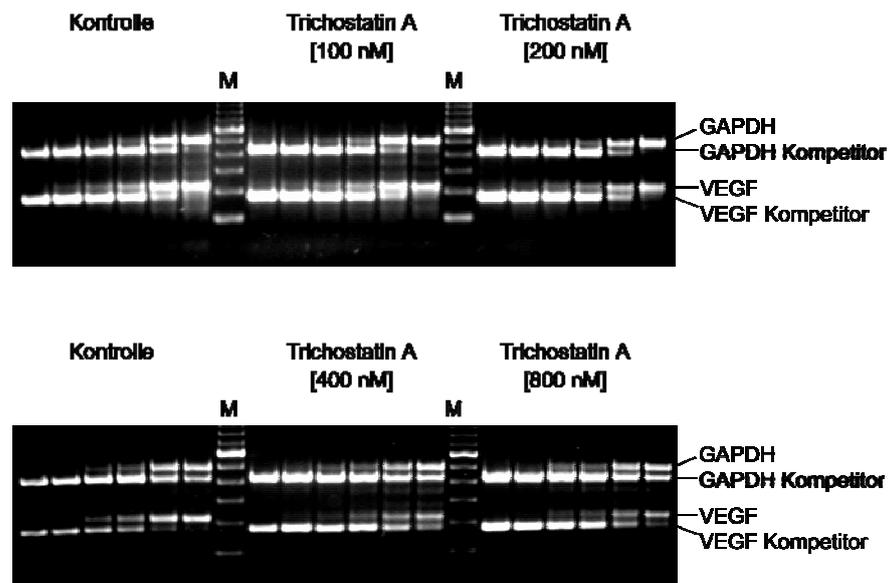


Abbildung 3.12

A: RT-kompetitive Multiplex-PCR von VEGF zusammen mit GAPDH in Caco-2 Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Valproat [3mM] oder Butyrat [3mM]. Repräsentativ ist eine von drei unabhängigen PCR dargestellt.

B: Relative Abnahme der VEGF mRNA in Caco-2 Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Valproat [3mM] oder Butyrat [3mM] im Verhältnis zu GAPDH (n=3)

A



B

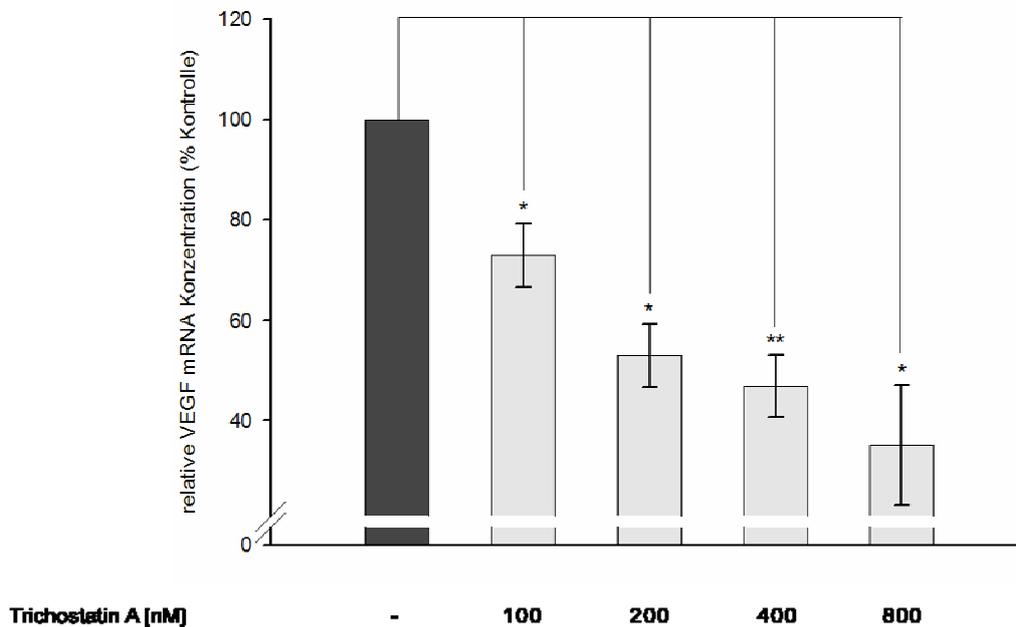


Abbildung 3.13

- A: RT-kompetitive Multiplex-PCR von VEGF zusammen mit GAPDH in Caco-2 Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Trichostatin A [100 nM, 200 nM, 400 nM, 800 nM]. Repräsentativ ist jeweils eine von drei unabhängigen PCR dargestellt.
- B: Relative Abnahme der VEGF mRNA in Caco-2 Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Trichostatin A [100 nM, 200 nM, 400 nM, 800 nM] im Verhältnis zu GAPDH (n=3)

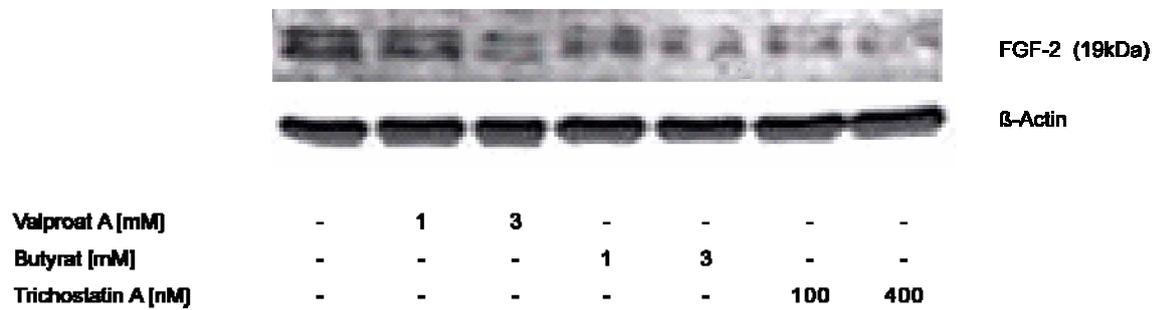
### 3.3.4 Proteinexpression von FGF-2

Über den Einfluss von HDAC-Inhibitoren auf die Expression des *basic fibroblast growth factors* (FGF-2) sind in der Literatur keine Angaben zu finden (Medline Research 1970-2005). Im Folgenden wurde daher die Wirkung von Valproat, Butyrat und Trichostatin A auf die Proteinexpression dieses Faktors untersucht.

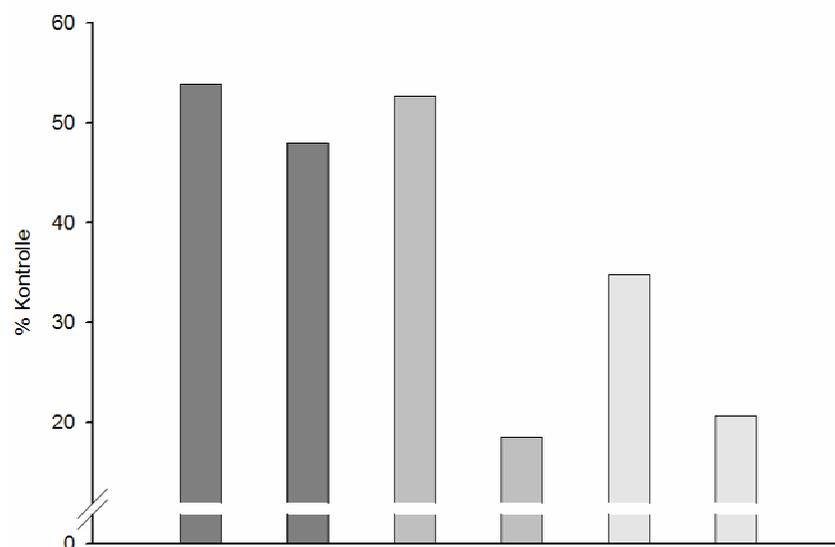
Hierzu wurden subkonfluente Caco-2 Zellen in Standardmedium oder Medium supplementiert mit Valproat [1 mM, 3 mM], Butyrat [1 mM, 3 mM] oder Trichostatin A [100 nM, 400 nM] inkubiert. Nach 6, 12, 24 und 48 Stunden erfolgte die Probengewinnung und die Detektion des FGF-2 Proteins durch Western Blot mittels eines spezifischen Antikörpers. Als quantitative Kontrolle gleicher Proteinmengen diente die Bestimmung von  $\beta$ -Actin in den Proben. Die Banden der Western Blots wurden anschließend densitometrisch ausgewertet, im Verhältnis zu  $\beta$ -Actin quantifiziert und die Ergebnisse in Prozent der jeweiligen Kontrolle graphisch dargestellt.

Wie aus den **Abbildungen 3.14a bis 3.17a** ersichtlich, verminderte die Behandlung der Caco-2 Zellen mit allen eingesetzten HDAC-Inhibitoren die Proteinexpression von FGF-2 jeweils dosisabhängig. Die Effekte von Valproat [1 mM, 3 mM] waren nach 24 und 48 Stunden Inkubation am stärksten ausgeprägt. Die signifikanteste Abnahme des FGF-2 Proteins war in den Butyratproben [1 mM, 3 mM] nach 24 Stunden Inkubationsdauer zu beobachten. Trichostatin A [100 nM, 400 nM] zeigte insgesamt die stärksten Effekte auf die FGF-2 Proteinexpression, am deutlichsten war die Abnahme nach 24 und 48 Stunden.

Die densitometrische Auswertung der Western Blot Banden (**Abbildung 3.14b bis 3.17b**) ergab infolge Behandlung mit Valproat [1 mM] für alle untersuchten Zeiten eine Abnahme der FGF-2 Expression auf jeweils etwa 50% der jeweiligen Kontrolle. Valproat [3 mM] reduzierte die Expression auf 20 bis 48% der jeweiligen Kontrolle. Die Behandlung der Caco-2 Zellen mit Butyrat [1 mM] führte zu einer Abnahme des FGF-2 Proteins auf Werte zwischen 32% und 53% der jeweiligen Kontrolle, Butyrat [3 mM] reduzierte die FGF-2 Proteinexpression auf 19% bis 25% der jeweiligen Kontrolle. Die Inkubation mit Trichostatin A [100 nM] reduzierte die Expression von FGF-2 auf jeweils etwa 30% der Kontrolle, die Behandlung mit Trichostatin A [400 nM] ergab Werte zwischen 3% und 21% der jeweiligen Kontrolle.

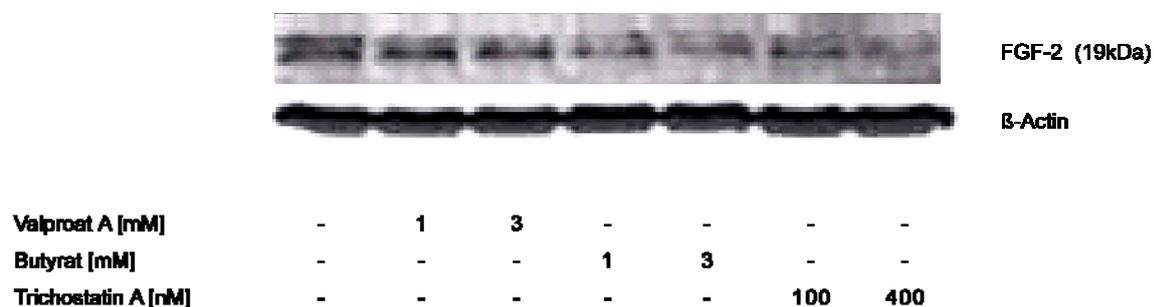


**Abbildung 3.14a** Western Blot des FGF-2 Proteins im Gesamthomogenat der Caco-2 Zellen nach 6-stündiger Inkubation mit Valproat [1 mM, 3 mM], Butyrat [1 mM, 3 mM] oder Trichostatin A [100 nM, 400 nM]. Repräsentativ ist einer von drei unabhängigen Western Blots dargestellt.

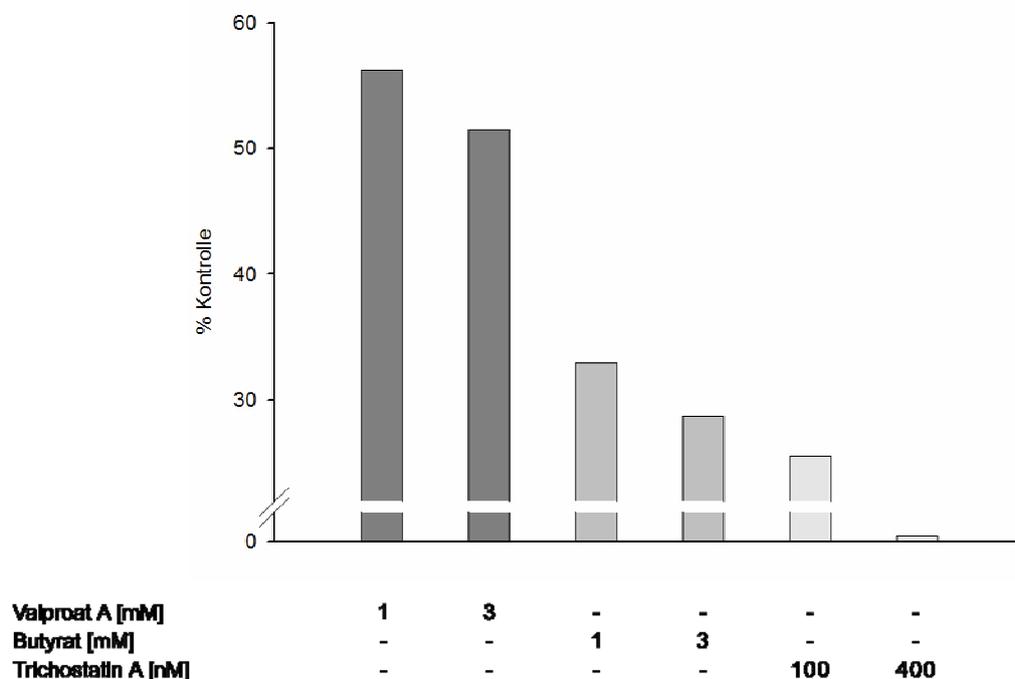


|                            |          |          |          |          |            |            |
|----------------------------|----------|----------|----------|----------|------------|------------|
| <b>Valproat A [mM]</b>     | <b>1</b> | <b>3</b> | -        | -        | -          | -          |
| <b>Butyrat [mM]</b>        | -        | -        | <b>1</b> | <b>3</b> | -          | -          |
| <b>Trichostatin A [nM]</b> | -        | -        | -        | -        | <b>100</b> | <b>400</b> |

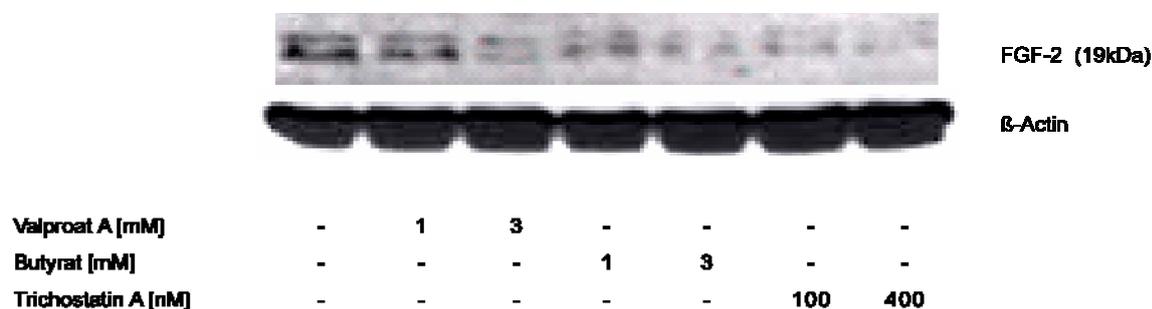
**Abbildung 3.14b** Quantifizierung des FGF-2 Proteins im Gesamthomogenat der Caco-2 Zellen nach 6-stündiger Inkubation mit Valproat [1 mM, 3 mM], Butyrat [1 mM, 3 mM] oder Trichostatin A [100 nM, 400 nM]. Der Western Blot aus Abbildung 3.14a wurde densitometrisch ausgewertet und im Verhältnis zu  $\beta$ -Actin quantifiziert.



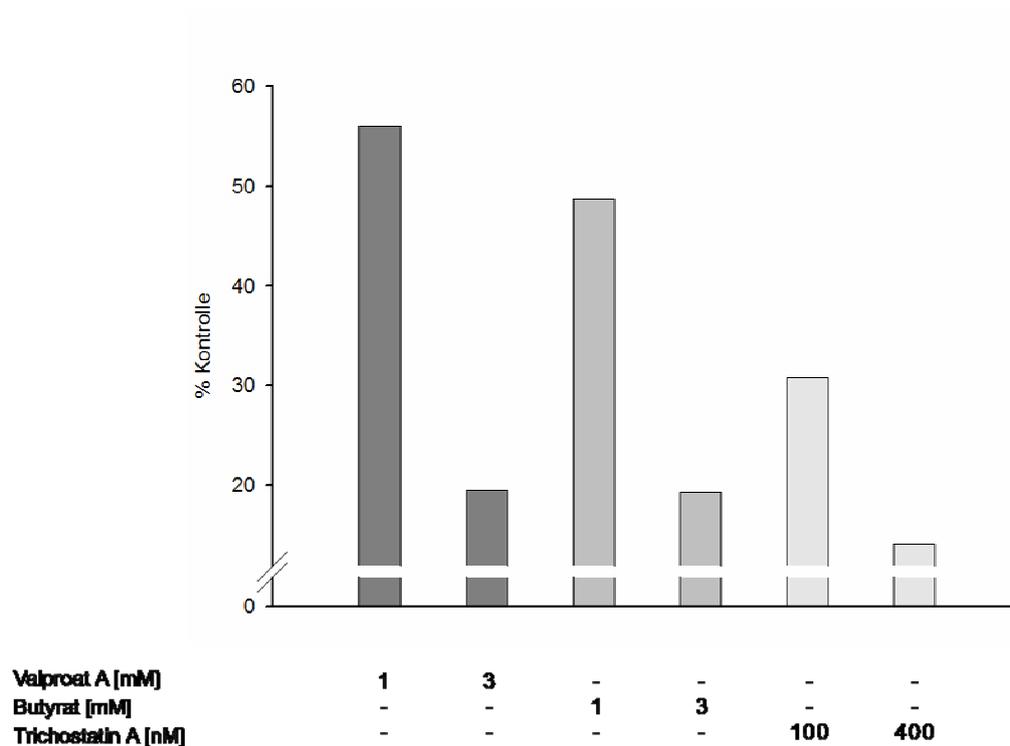
**Abbildung 3.15a** Western Blot des FGF-2 Proteins im Gesamthomogenat der Caco-2 Zellen nach 12-stündiger Inkubation mit Valproat [1 mM, 3 mM], Butyrat [1 mM, 3 mM] oder Trichostatin A [100 nM, 400 nM]. Repräsentativ ist einer von drei unabhängigen Western Blots dargestellt.



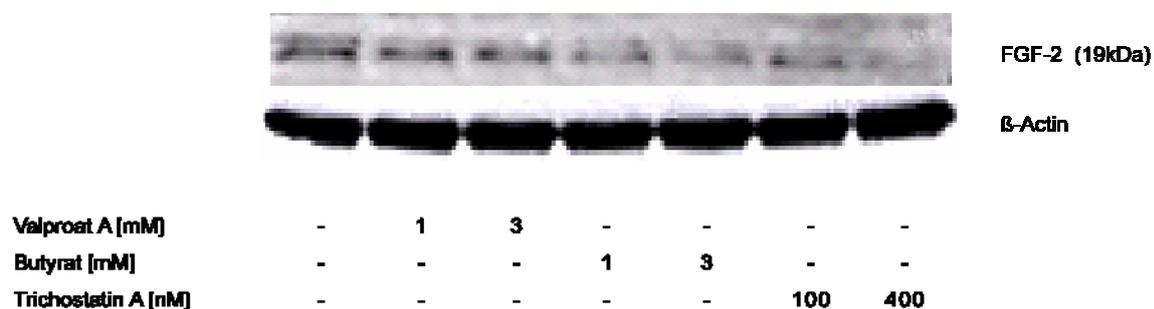
**Abbildung 3.15b** Quantifizierung des FGF-2 Proteins im Gesamthomogenat der Caco-2 Zellen nach 12-stündiger Inkubation mit Valproat [1 mM, 3 mM], Butyrat [1 mM, 3 mM] oder Trichostatin A [100 nM, 400 nM]. Der Western Blot aus Abbildung 3.15a wurde densitometrisch ausgewertet und im Verhältnis zu  $\beta$ -Actin quantifiziert.



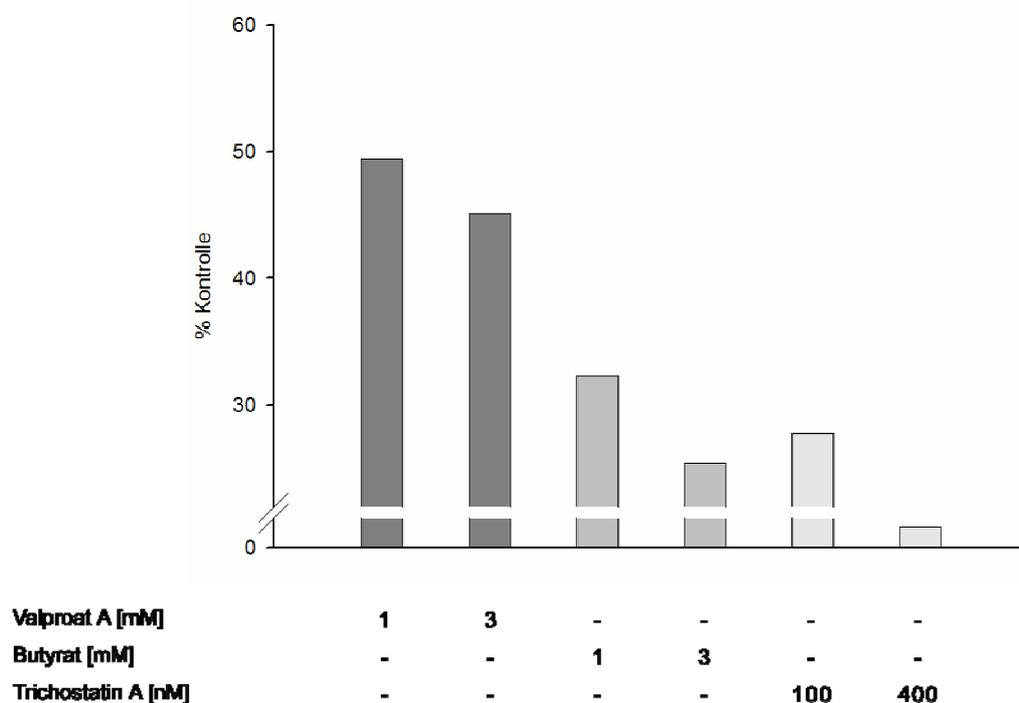
**Abbildung 3.16a** Western Blot des FGF-2 Proteins im Gesamthomogenat der Caco-2 Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Valproat [1 mM, 3 mM], Butyrat [1 mM, 3 mM] oder Trichostatin A [100 nM, 400 nM]. Repräsentativ ist einer von drei unabhängigen Western Blots dargestellt.



**Abbildung 3.16b** Quantifizierung des FGF-2 Proteins im Gesamthomogenat der Caco-2 Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Valproat [1 mM, 3 mM], Butyrat [1 mM, 3 mM] oder Trichostatin A [100 nM, 400 nM]. Der Western Blot aus Abbildung 3.16a wurde densitometrisch ausgewertet und im Verhältnis zu  $\beta$ -Actin quantifiziert.



**Abbildung 3.17a** Western Blot des FGF-2 Proteins im Gesamthomogenat der Caco-2 Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit Valproat [1 mM, 3 mM], Butyrat [1 mM, 3 mM] oder Trichostatin A [100 nM, 400 nM]. Repräsentativ ist einer von drei unabhängigen Western Blots dargestellt.



**Abbildung 3.17b** Quantifizierung des FGF-2 Proteins im Gesamthomogenat der Caco-2 Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit Valproat [1 mM, 3 mM], Butyrat [1 mM, 3 mM] oder Trichostatin A [100 nM, 400 nM]. Der Western Blot aus Abbildung 3.17a wurde densitometrisch ausgewertet und im Verhältnis zu  $\beta$ -Actin quantifiziert.

### 3.4 Einfluss von Valproat, Butyrat und Trichostatin A auf Angiogenese-relevante Faktoren

Der Transkriptionsfaktor *hypoxia inducible factor-1 $\alpha$*  (HIF-1 $\alpha$ ) wird in der Mehrheit humaner Tumore – so auch in kolorektalen Karzinomen – verstärkt exprimiert [171;172]. HIF-1 $\alpha$  kontrolliert die Expression der angiogenen Faktoren VEGF und FGF-2 und leistet somit einen entscheidenden Beitrag zur Induktion der tumorinduzierten Angiogenese. Die Synthese von HIF-1 $\alpha$  wird vor allem über den PI3-Kinase/AKT Signaltransduktionsweg vermittelt, der Abbau des Transkriptionsfaktors erfolgt über das Ubiquitin-Proteasom-System (s. Kap. 1.2.3). Nächstes Ziel dieser Arbeit war, die Wirkung von Valproat, Butyrat und Trichostatin A auf die Expression und Aktivität von HIF-1 $\alpha$  zu untersuchen sowie Erkenntnisse über mögliche Wirkmechanismen dieser Substanzen im proteasomalen System und dem PI3-Kinase/AKT Signalweg zu gewinnen.

#### 3.4.1 Proteinexpression von HIF-1 $\alpha$

Zunächst war von Interesse, welchen Einfluss die hier verwendeten Histondeacetylase-Inhibitoren auf die Proteinexpression von HIF-1 $\alpha$  in Caco-2 Zellen ausüben.

Subkonfluente Caco-2 Zellen wurden mit Standardmedium oder Medium supplementiert mit Valproat [1 mM, 3 mM], Butyrat [1 mM, 3 mM] oder Trichostatin A [100 nM, 400 nM] inkubiert. Nach 6, 12, 24 und 48 Stunden erfolgte die Probengewinnung und die Detektion des HIF-1 $\alpha$  Proteins mittels spezifischem Antikörper nach der Western Blot Methode. Als quantitative Kontrolle gleicher Proteinmengen diente die Bestimmung von  $\beta$ -Actin in den Proben. Die Banden der Western Blots wurden densitometrisch ausgewertet, im Verhältnis zu  $\beta$ -Actin quantifiziert und die Resultate in Prozent der jeweiligen Kontrolle graphisch dargestellt.

Wie aus der **Abbildung 3.18a** ersichtlich, verstärkte die Behandlung mit allen eingesetzten Substanzen die HIF-1 $\alpha$  Proteinexpression im Zelllysat von Caco-2 Zellen konzentrationsabhängig. Dabei induzierte Valproat in beiden Konzentrationen eine stetige Zunahme des HIF-1 $\alpha$  Proteins über 6, 12 und 24 Stunden. Einen analogen Verlauf zeigten die Butyratproben. Hier traten die jeweiligen Effekte sogar noch deutlicher zutage. Trichostatin A

induzierte einen Anstieg der HIF-1 $\alpha$  Proteinexpression nach 6 Stunden, der nach 12 Stunden weiter erhöht war. Nach 24 Stunden fiel die Expressionssteigerung dann geringer aus. Durch alle Behandlungssubstanzen wurde nach 48 Stunden Inkubationsdauer eine vergleichsweise geringe Expressionssteigerung des HIF-1 $\alpha$  Proteins induziert.

Die densitometrische Auswertung der Western Blot Banden (**Abbildung 3.18b-e**) ergab für Valproat [1 mM] einen Anstieg der HIF-1 $\alpha$  Proteinexpression auf 115% nach 6 Stunden, auf 122% nach 12 Stunden, auf 126% nach 24 Stunden sowie auf 112% nach 48 Stunden im Vergleich zur jeweiligen Kontrolle. Valproat [3 mM] führte zu einer Zunahme des HIF-1 $\alpha$  Proteins auf 117% (6 h), 124% (12 h), 132% (24 h) sowie auf 122% (48 h) der Kontrolle. Die Behandlung der Caco-2 Zellen mit Butyrat [1 mM] induzierte die HIF-1 $\alpha$  Proteinexpression auf 111% nach 6 Stunden, auf 130% nach 12 Stunden, auf 134% nach 24 Stunden sowie auf 111% nach 48 Stunden verglichen mit dem jeweiligen Kontrollwert. Durch Butyrat [3 mM] wurde die Expression des Transkriptionsfaktors auf 130% (6 h), 146% (12 h), 163% (24 h) sowie auf 120% (48 h) der Kontrolle gesteigert. Trichostatin A [100 nM] induzierte eine Zunahme der HIF-1 $\alpha$  Proteinexpression auf 123% nach 6 Stunden, auf 136% nach 12 Stunden, auf 133% nach 24 Stunden sowie auf 109% nach 48 Stunden. Die Inkubation mit Trichostatin A [400 nM] führte zu einem Anstieg der HIF-1 $\alpha$  Proteinexpression auf 128% (6 h), 142% (12 h), 138% (24 h) sowie 109% (48 h) im Vergleich mit der jeweiligen Kontrolle.

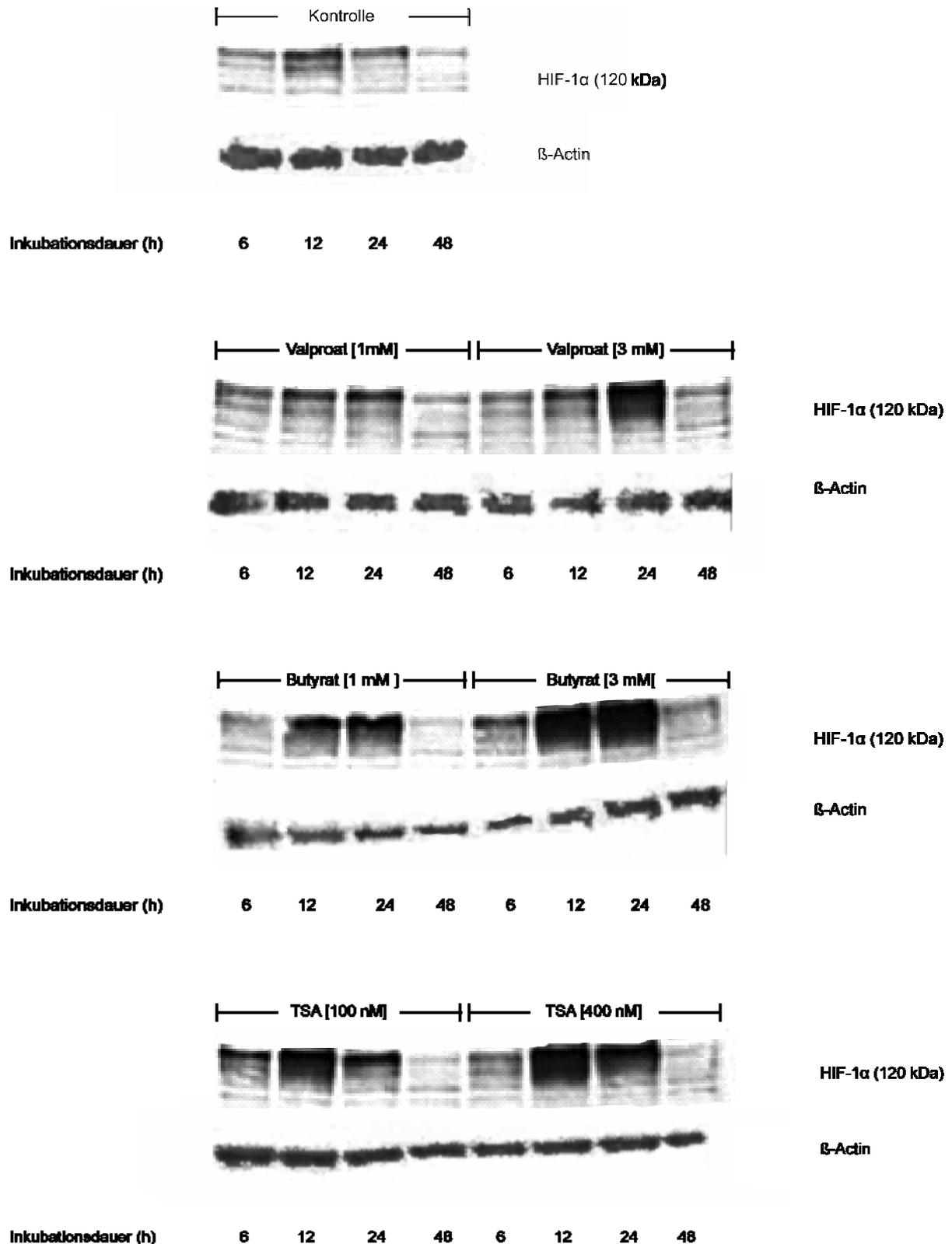
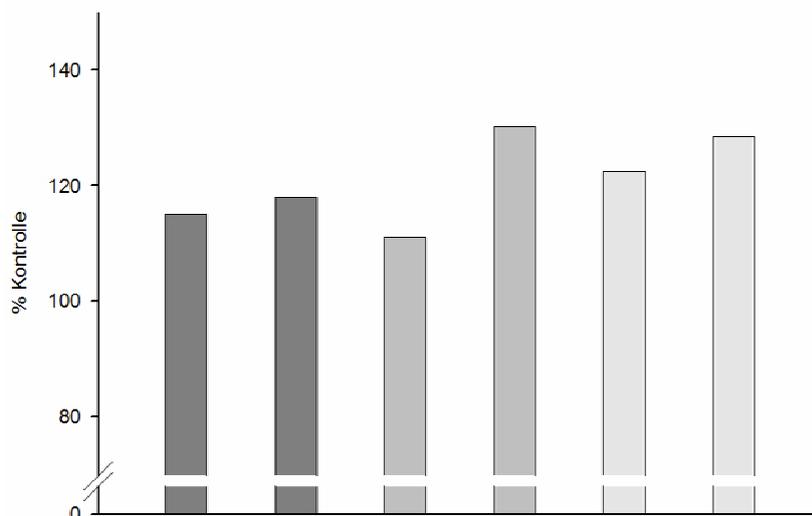


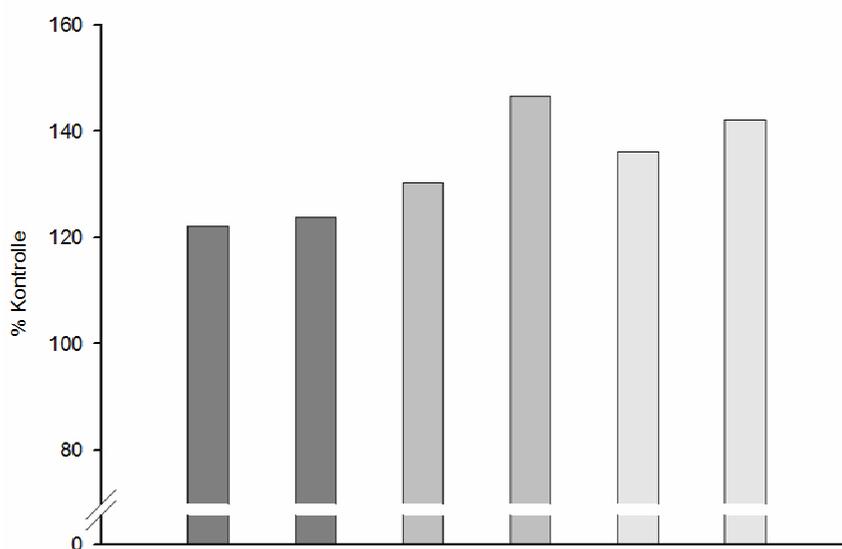
Abbildung 3.18a

Western Blot des HIF-1 $\alpha$  Proteins im Gesamthomogenat der Caco-2 Zellen nach 6-stündiger Inkubation mit Valproat [1 mM, 3 mM], Butyrat [1 mM, 3 mM] oder Trichostatin A [100 nM, 400 nM]. Repräsentativ ist jeweils einer von drei unabhängigen Western Blots dargestellt. Zusätzlich auftretende Banden bei 120 kDa sind auf eine posttranslationale Modifikation von HIF-1 $\alpha$  zurückzuführen.



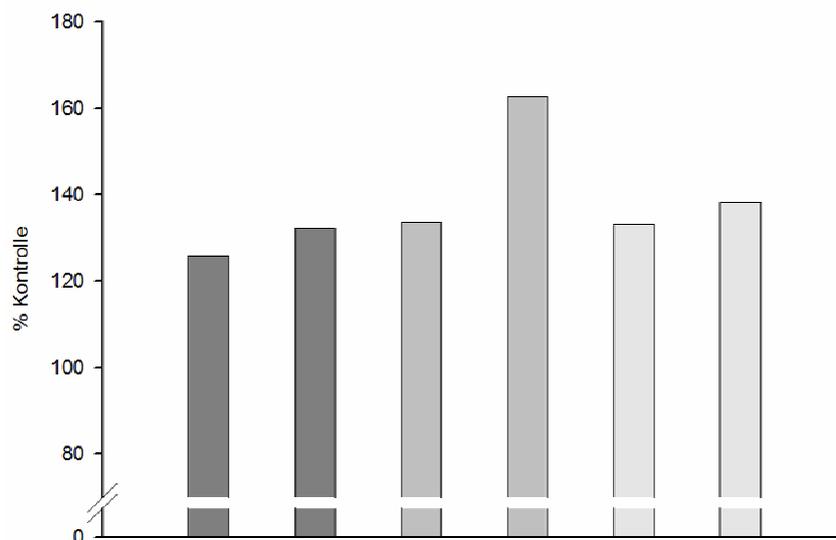
|                     |          |          |          |          |            |            |
|---------------------|----------|----------|----------|----------|------------|------------|
| Valproat A [mM]     | <b>1</b> | <b>3</b> | -        | -        | -          | -          |
| Butyrat [mM]        | -        | -        | <b>1</b> | <b>3</b> | -          | -          |
| Trichostatin A [nM] | -        | -        | -        | -        | <b>100</b> | <b>400</b> |

**Abbildung 3.18b** Quantifizierung des HIF-1 $\alpha$  Proteins im Gesamthomogenat der Caco-2 Zellen nach 6-stündiger Inkubation mit Valproat [1 mM, 3 mM], Butyrat [1 mM, 3 mM] oder Trichostatin A [100 nM, 400 nM]. Der Western Blot aus Abbildung 3.18a (6h) wurde densitometrisch ausgewertet und im Verhältnis zu  $\beta$ -Actin quantifiziert.



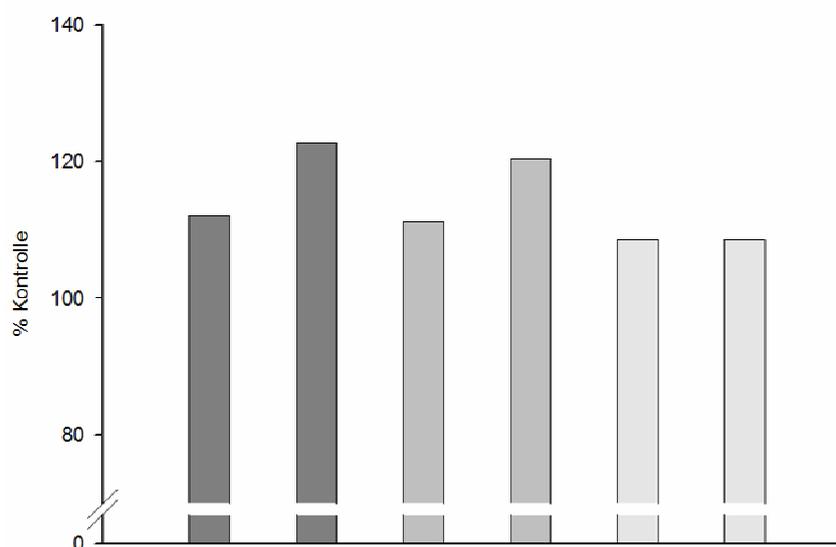
|                     |          |          |          |          |            |            |
|---------------------|----------|----------|----------|----------|------------|------------|
| Valproat A [mM]     | <b>1</b> | <b>3</b> | -        | -        | -          | -          |
| Butyrat [mM]        | -        | -        | <b>1</b> | <b>3</b> | -          | -          |
| Trichostatin A [nM] | -        | -        | -        | -        | <b>100</b> | <b>400</b> |

**Abbildung 3.18c** Quantifizierung des HIF-1 $\alpha$  Proteins im Gesamthomogenat der Caco-2 Zellen nach 12-stündiger Inkubation mit Valproat [1 mM, 3 mM], Butyrat [1 mM, 3 mM] oder Trichostatin A [100 nM, 400 nM]. Der Western Blot aus Abbildung 3.18a (12h) wurde densitometrisch ausgewertet und im Verhältnis zu  $\beta$ -Actin quantifiziert.



|                            |          |          |          |          |            |            |
|----------------------------|----------|----------|----------|----------|------------|------------|
| <b>Valproat A [mM]</b>     | <b>1</b> | <b>3</b> | -        | -        | -          | -          |
| <b>Butyrat [mM]</b>        | -        | -        | <b>1</b> | <b>3</b> | -          | -          |
| <b>Trichostatin A [nM]</b> | -        | -        | -        | -        | <b>100</b> | <b>400</b> |

**Abbildung 3.18d** Quantifizierung des HIF-1 $\alpha$  Proteins im Gesamthomogenat der Caco-2 Zellen nach 24-stündiger Inkubation mit Valproat [1 mM, 3 mM], Butyrat [1 mM, 3 mM] oder Trichostatin A [100 nM, 400 nM]. Der Western Blot aus Abbildung 3.18a (24h) wurde densitometrisch ausgewertet und im Verhältnis zu  $\beta$ -Actin quantifiziert.



|                            |          |          |          |          |            |            |
|----------------------------|----------|----------|----------|----------|------------|------------|
| <b>Valproat A [mM]</b>     | <b>1</b> | <b>3</b> | -        | -        | -          | -          |
| <b>Butyrat [mM]</b>        | -        | -        | <b>1</b> | <b>3</b> | -          | -          |
| <b>Trichostatin A [nM]</b> | -        | -        | -        | -        | <b>100</b> | <b>400</b> |

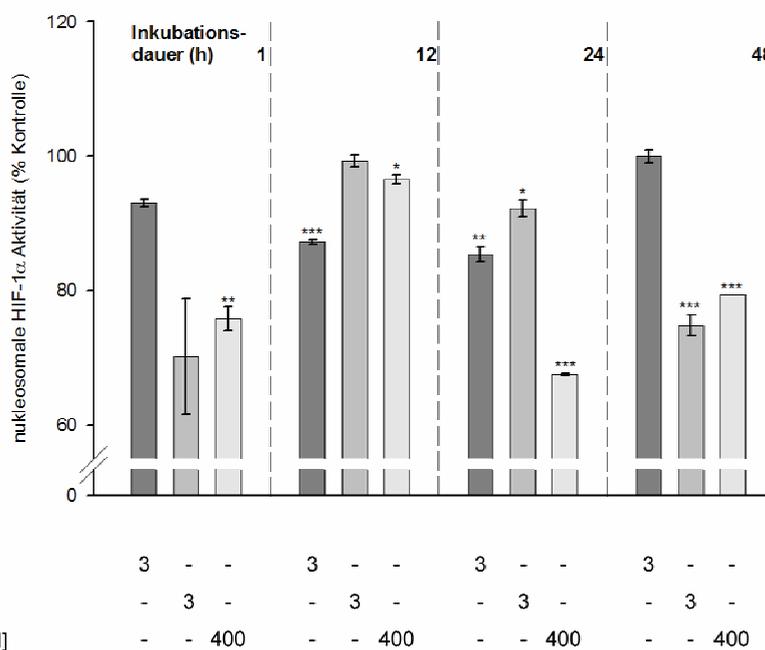
**Abbildung 3.18e** Quantifizierung des HIF-1 $\alpha$  Proteins im Gesamthomogenat der Caco-2 Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit Valproat [1 mM, 3 mM], Butyrat [1 mM, 3 mM] oder Trichostatin A [100 nM, 400 nM]. Der Western Blot aus Abbildung 3.18a (48h) wurde densitometrisch ausgewertet und im Verhältnis zu  $\beta$ -Actin quantifiziert.

### 3.4.2 HIF-1 $\alpha$ Aktivität

Wie im vorangegangenen Versuch gezeigt, führte die Inkubation der Caco-2 Zellen mit den hier eingesetzten Substanzen zu einer Zunahme der HIF-1 $\alpha$  Proteinexpression im Zelllysate von Caco-2 Zellen. Im Folgenden war von Interesse, ob – und gegebenenfalls wie – die Aktivität dieses Transkriptionsfaktors in der Kernfraktion von Caco-2 Zellen durch eine entsprechende Behandlung moduliert wird.

Hierzu wurden subkonfluente Caco-2 Zellen mit Standardmedium oder Medium supplementiert mit Valproat [3 mM], Butyrat [3 mM] oder Trichostatin A [400 nM] inkubiert. Die Präparation der nukleären Proteinfraction erfolgte nach jeweils 1, 12, 24 und 48 Stunden unter Verwendung eines Kernextraktion-Assays (*Nuclear Extract Kit*). Anschließend wurde mit Hilfe des Assays *TransAM™ HIF-1* die Aktivität des Transkriptionsfaktors HIF-1 $\alpha$  in den nukleären Extrakten detektiert und quantifiziert.

Wie aus **Abbildung 3.19** ersichtlich, führte die Behandlung von Caco-2 Zellen mit Valproat [3 mM] nach 1 Stunde zu einer Abnahme der HIF-1 $\alpha$  Aktivität in der nukleären Zellfraktion auf ca. 93% der Kontrolle. Die 12- bzw. 24-stündige Inkubation führte zu einer jeweils hochsignifikanten ( $p < 0,001$  bzw.  $p < 0,01$ ) Reduktion der Aktivität auf ca. 87% bzw. ca. 85% der Kontrollwerte. Nach 48 Stunden Inkubation mit Valproat war die Aktivität von HIF-1 $\alpha$  etwa der Kontrolle entsprechend (ca. 100%). Butyrat [3 mM] reduzierte die Aktivität des Transkriptionsfaktors in der Kernfraktion der Caco-2 Zellen nach 1 Stunde auf ca. 70% der Kontrolle. Die 12-stündige Inkubation ergab keine Abnahme der Aktivität (ca. 99%). Nach 24 Stunden bzw. 48 Stunden Inkubation wurde die HIF-1 $\alpha$  Aktivität signifikant ( $p < 0,05$ ) auf ca. 92% bzw. hochsignifikant ( $p < 0,001$ ) auf ca. 75% reduziert. Die Behandlung mit Trichostatin A [400 nM] resultierte in einer Abnahme der HIF-1 $\alpha$  Aktivität auf ca. 76% der Kontrolle nach 1 Stunde (hochsignifikant,  $p < 0,01$ ) und auf ca. 97% der Kontrolle nach 12 Stunden (signifikant,  $p < 0,05$ ). Nach 24 bzw. 48 Stunden Inkubation mit Trichostatin A [400 nM] war die Aktivität des Transkriptionsfaktors auf ca. 68% bzw. auf ca. 79% jeweils hochsignifikant ( $p < 0,001$ ) reduziert.

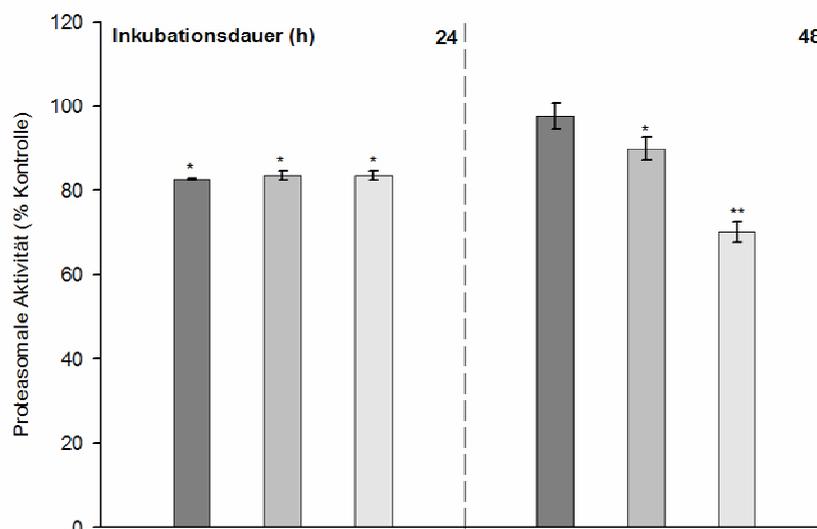


**Abbildung 3.19** Aktivität des HIF-1 $\alpha$  Proteins in der nukleären Fraktion von Caco-2 Zellen nach 1-, 12-, 24- und 48-stündiger Inkubation mit Valproat [3 mM], Butyrat [3 mM] oder Trichostatin A [400 nM]. Die Ergebnisse sind in Prozent der jeweiligen Kontrolle, die auf 100% gesetzt wurde, angegeben (n=3).

### 3.4.3 Proteasomale Aktivität in Caco-2 Zellen

Der Ubiquitin-Proteasom-Weg ist das vorherrschende proteolytische System im Cytosol eukaryontischer Zellen. Auch die Degradierung von HIF-1 $\alpha$  wird über diesen Signalweg vermittelt [345]. Im folgenden Versuch sollte ermittelt werden, wie Valproat, Butyrat und Trichostatin A die proteasomale Aktivität in Caco-2 Zellen beeinflussen.

Subkonfluente Caco-2 Zellen wurden mit Standardmedium oder Medium supplementiert mit Valproat [3 mM], Butyrat [3 mM] oder Trichostatin A [400 nM] für die Dauer von 24 bzw. 48 Stunden inkubiert. Nach Aufbereitung der gewonnenen Proben wurde unter Verwendung des *20S Proteasome Activity Assay Kits* die proteasomale Aktivität im Zelllysat der Caco-2 Zellen durch Detektion des Fluorophors 7-Amino-4-methylcoumarin (AMC) bestimmt. Die proteasomale Aktivität wurde auf den Proteingehalt der jeweiligen Probe bezogen. Die Ergebnisse sind in Prozent der jeweiligen Kontrolle angegeben.



|                     |   |   |     |   |   |     |
|---------------------|---|---|-----|---|---|-----|
| Valproat A [mM]     | 3 | - | -   | 3 | - | -   |
| Butyrat [mM]        | - | 3 | -   | - | 3 | -   |
| Trichostatin A [nM] | - | - | 400 | - | - | 400 |

**Abbildung 3.20** Proteasomale Aktivität im Zelllysat von Caco-2 Zellen nach 24- bzw. 48-stündiger Inkubation mit Valproat [3 mM], Butyrat [3 mM] oder Trichostatin A [400 nM]. Die Ergebnisse sind in Prozent der jeweiligen Kontrolle, die auf 100% gesetzt wurde, angegeben (n=4).

Wie aus **Abbildung 3.20** ersichtlich, wurde die proteasomale Aktivität im Zelllysate der Caco-2 Zellen durch Behandlung mit allen eingesetzten Substanzen nach 24 Stunden Inkubation jeweils signifikant ( $p < 0,05$ ) gehemmt. Dabei war für Valproat [3 mM] eine Abnahme auf ca. 83% der Kontrollwerte zu beobachten. Die Inkubation mit Butyrat [3 mM] sowie mit Trichostatin A [400 nM] ergab eine Inhibition der proteasomalen Aktivität auf jeweils ca. 84% der Kontrolle. Nach 48 Stunden war die proteasomale Aktivität durch Inkubation mit Butyrat [3 mM] signifikant ( $p < 0,05$ ) bzw. durch Inkubation mit Trichostatin A [400 nM] hochsignifikant ( $p < 0,01$ ) reduziert (auf ca. 90% bzw. auf ca. 70% der Kontrollwerte). Die Inkubation mit Valproat [3 mM] ergab mit einer Abnahme der proteasomalen Aktivität auf ca. 98% kein signifikantes Resultat.

### 3.4.4 Der PI3-Kinase/AKT Signaltransduktionsweg

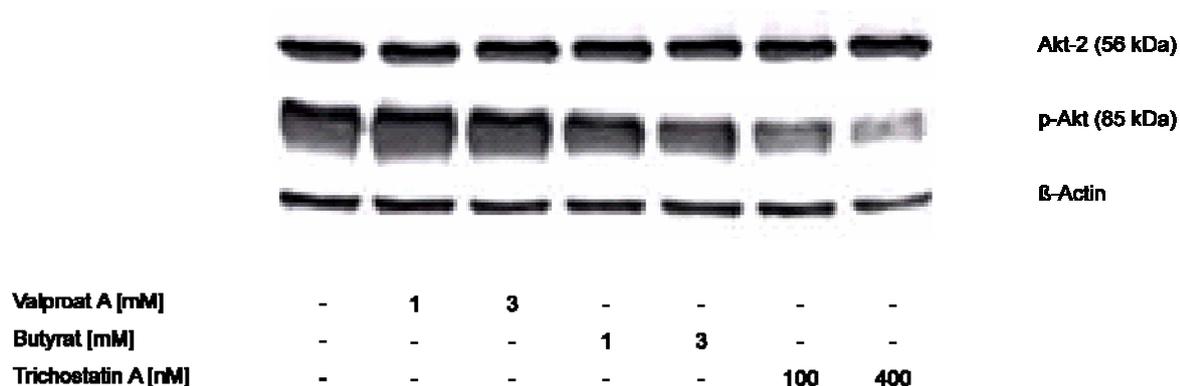
Ein wichtiger Signalweg der HIF-1 $\alpha$  Aktivierung wird über die Phosphoinositol-3-Kinase (PI3-Kinase/PI3K) und die nachgeschaltete Proteinkinase B (AKT) vermittelt (s. Kap. 1.2.3). Zunächst wurde der Einfluss der eingesetzten Behandlungssubstanzen auf die Proteinexpression der inaktiven Form der Proteinkinase B (Akt-2) mit ihrer Wirkung auf die phosphorylierte – und somit aktivierten Form (p-Akt) – verglichen.

Hierzu wurden subkonfluente Caco-2 Zellen mit Standardmedium oder Medium supplementiert mit Valproat [1 mM, 3 mM], Butyrat [1 mM, 3 mM] oder Trichostatin A [100 nM, 400 nM] inkubiert. Nach 60 Minuten wurden die Zellen lysiert und das Akt-2 bzw. das p-Akt Protein jeweils mittels spezifischem Antikörper nach der Western Blot Methode nachgewiesen. Als quantitative Kontrolle gleicher Proteinmengen diente die Bestimmung von  $\beta$ -Actin in den Proben. Die Banden der Western Blots wurden anschließend densitometrisch ausgewertet, im Verhältnis zu  $\beta$ -Actin quantifiziert und die Ergebnisse in Prozent der jeweiligen Kontrolle graphisch dargestellt.

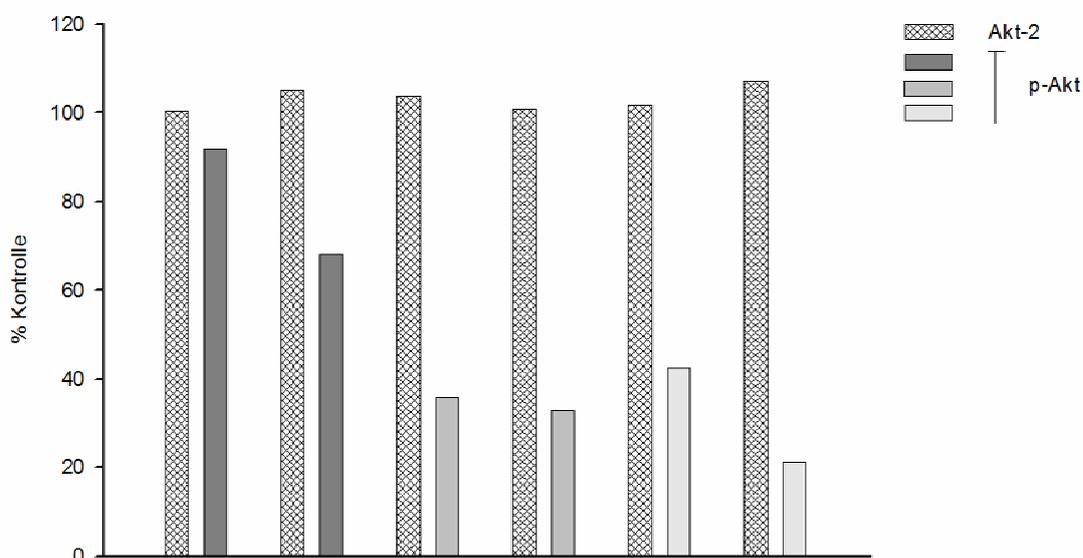
Wie aus **Abbildung 3.21a** (repräsentative Darstellung von drei Western Blots) ersichtlich, wurde die Akt-2 Proteinexpression durch Behandlung der Caco-2 Zellen mit den verwendeten Substanzen nicht merklich moduliert.

Dies gilt ebenso für die Expression des p-Akt Proteins durch Valproat [1 mM]. Valproat [3 mM] reduzierte die Proteinexpression geringfügig. Die Behandlung mit Butyrat [1 mM, 3 mM] zeigte dosisabhängig stärker hemmende Effekte auf die p-Akt Proteinexpression. Die Behandlung der Zellen mit Trichostatin A [100 nM, 400 nM] führte konzentrationsabhängig zur deutlichsten Abnahme der p-Akt Proteinexpression.

Die densitometrisch ermittelten Werte der Akt-2 Proteinexpression lagen zwischen 100% und 107% der jeweiligen Kontrollwerte. Für die p-Akt Proteinexpression ergab die densitometrische Auswertung der Western Blot Banden nach Inkubation mit Valproat [1 mM] eine Abnahme auf etwa 84% im Vergleich zur Kontrolle. Nach Inkubation mit Valproat [3 mM] war eine Reduktion des p-Akt Proteins auf ca. 68% der Kontrolle zu beobachten. Butyrat [1 mM] reduzierte die Expression auf ca. 36%, Butyrat [3 mM] auf ca. 33% der jeweiligen Kontrolle. Die Inkubation der Caco-2 Zellen mit Trichostatin A [100 nM] verringerte die p-Akt Proteinexpression auf ca. 43%. Trichostatin A [400 nM] führte zu einer Abnahme der Expression des p-Akt Proteins auf ca. 21% im Vergleich zur Kontrolle (**Abbildung 3.21b**).

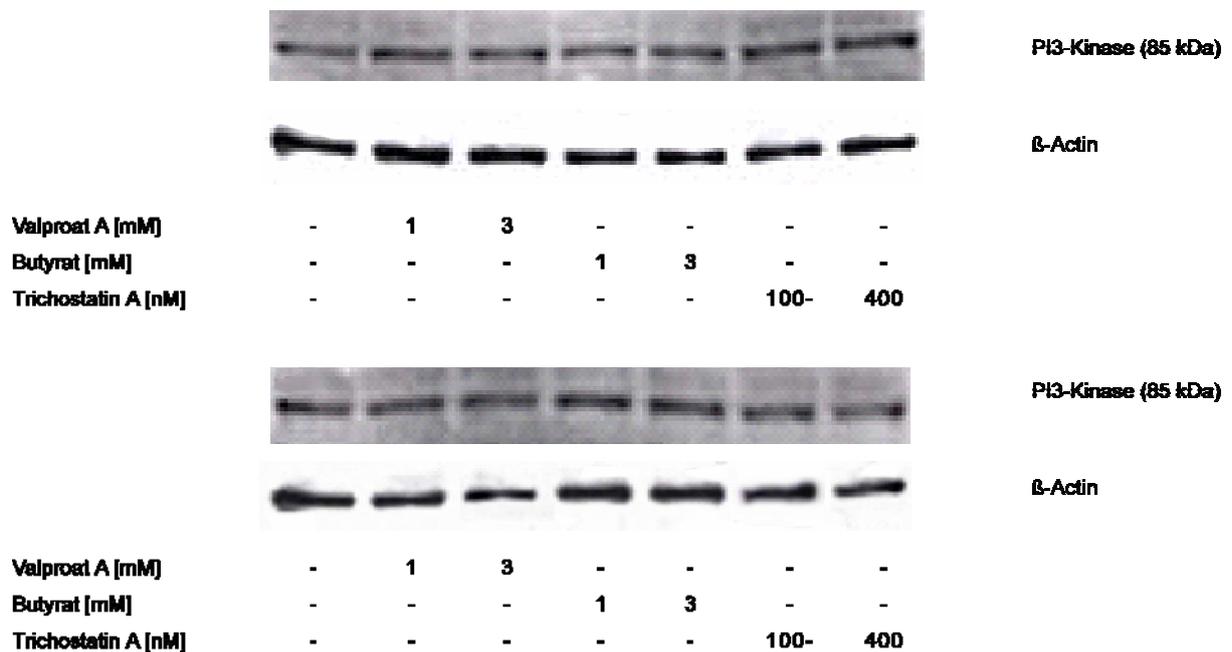


**Abbildung 3.21a** Western Blots des Akt-2 und des p-Akt Proteins im Gesamthomogenat der Caco-2 Zellen nach 60-minütiger Inkubation mit Valproat [1 mM, 3 mM], Butyrat [1 mM, 3 mM] oder Trichostatin A [100 nM, 400 nM]. Repräsentativ ist jeweils einer von drei unabhängigen Western Blots dargestellt.



|                            |   |   |   |   |   |   |   |   |     |     |
|----------------------------|---|---|---|---|---|---|---|---|-----|-----|
| <b>Valproat A [mM]</b>     | 1 | 1 | 3 | 3 | - | - | - | - | -   | -   |
| <b>Butyrat [mM]</b>        | - | - | - | - | 1 | 1 | 3 | 3 | -   | -   |
| <b>Trichostatin A [nM]</b> | - | - | - | - | - | - | - | - | 100 | 100 |
|                            |   |   |   |   |   |   |   |   | 400 | 400 |

**Abbildung 3.21b** Quantifizierung des Akt-2 und des p-Akt Proteins im Gesamthomogenat der Caco-2 Zellen nach 60-minütiger Inkubation mit Valproat [1 mM, 3 mM], Butyrat [1 mM, 3 mM] oder Trichostatin A [100 nM, 400 nM]. Die Western Blots aus Abbildung 3.21a wurden densitometrisch ausgewertet und im Verhältnis zu β-Actin quantifiziert.



**Abbildung 3.22** Western Blots des PI3-Kinase Proteins in Caco-2 Zellen nach 10- und 30-minütiger Inkubation mit Valproat [1 mM, 3 mM], Butyrat [1 mM, 3 mM] oder Trichostatin A [100 nM, 400 nM]. Repräsentativ ist jeweils einer von drei unabhängigen Western Blots dargestellt.

Wie der vorangegangene Versuch gezeigt hat, wurde die Expression der phosphorylierten Form der Proteinkinase B (p-Akt) durch die eingesetzten HDAC-Inhibitoren z.T. signifikant reduziert. Um den Angriffspunkt der Substanzen in der PI3-Kinase/AKT Signaltransduktionskaskade möglicherweise weiter einzugrenzen, war nun von Interesse, wie die Proteinexpression der PI3-Kinase bei entsprechender Behandlung der Zellen beeinflusst wird. Subkonfluente Caco-2 Zellen wurden mit Standardmedium oder Medium supplementiert mit Valproat [1 mM, 3 mM], Butyrat [1 mM, 3 mM] oder Trichostatin A [100 nM, 400 nM] inkubiert. Nach 10 bzw. 30 Minuten erfolgte die Probengewinnung und die Detektion des PI3-Kinase Proteins durch Western Blot mittels eines spezifischen Antikörpers. Als quantitative Kontrolle gleicher Proteinmengen diente die Bestimmung von  $\beta$ -Actin in den Proben. Die Banden des Western Blots wurden anschließend densitometrisch ausgewertet und im Verhältnis zu  $\beta$ -Actin quantifiziert.

Wie aus **Abbildung 3.22** ersichtlich, wurde durch keine der eingesetzten Substanzen die Expression des PI3-Kinase Proteins im Zelllysate der Caco-2 Zellen merklich beeinflusst. Auch die densitometrische Auswertung der Western-Blot Banden ergab mit Werten zwischen 97% und 110% im Vergleich zu den jeweiligen Kontrollwerten keine signifikanten Modulationen der PI3-Kinase Proteinexpression (ohne Abbildung).

## 4 DISKUSSION

Die Hemmung der tumorinduzierten Angiogenese durch HDAC-Inhibitoren ist ein neues Forschungsgebiet. Die im Rahmen dieser Arbeit durchgeführten Untersuchungen sollen dazu beitragen, die Wirkung von Valproat, Butyrat und Trichostatin A auf Endothelzellen bzw. Kolonkarzinomzellen vergleichend zu charakterisieren und mögliche zugrundeliegende Wirkmechanismen aufzuzeigen. Als Modelle für die Untersuchungen dienten *human umbilical vein endothelial cells* (HUVECs) und die humane Kolonkarzinomzelllinie Caco-2.

### 4.1 HDAC-Inhibitoren und Angiogenese

Wie in Kapitel 1.3.1 beschrieben, wird der Acetylierungsgrad der *core* Histone durch die Aktivitäten von Histondeacetylasen (HDACs) und Histonacetyltransferasen (HATs) bestimmt. Als Hemmstoffe der Histondeacetylasen greifen Valproat, Butyrat und Trichostatin A durch die Induktion der Histonacetylierung in die transkriptionelle Regulation ein, wobei der genaue Mechanismus und die nachgeschalteten Effekte dieser Histonmodifizierung noch wenig erforscht sind. Sie bewirken vermutlich, dass an kritischen Genen die Acetylierung der Histone überwiegt und zahlreiche Gene überexprimiert werden [248;279;346;347]. Zu den mehrfach belegten Auswirkungen einer HDAC-Hemmung zählen die Unterbrechung des Zellzyklus und die Differenzierungs- und/oder Apoptoseinduktion neoplastischer Zellen [263;268;348].

Die gesteigerte Aktivität von Histondeacetylasen wurde kürzlich als ein Auslöser der Angiogeneseinduktion in neoplastischem Gewebe identifiziert (s. Kap. 1.3.2). Über die Wirkung von HDAC-Hemmstoffen auf die Angiogenese ist bislang noch wenig bekannt. Ein Bestandteil der vorliegenden Arbeit war daher die Untersuchung wichtiger endothelialer Zellfunktionen unter dem Einfluss der HDAC-Inhibitoren Valproat, Butyrat und Trichostatin A.

Wie die hier vorgestellten Ergebnisse zeigen, bewirkte die Inkubation von HUVECs mit dem HDAC-Inhibitor Valproat eine Hemmung der Endothelzellproliferation, einem der ersten Schritte im Angiogeneseprozess. Die sich *in vivo* anschließende Migration der Zellen in Richtung eines angiogenen Stimulus wurde durch Valproat in der Endothelzellkultur ebenfalls inhibiert. Anhand eines weiteren *in vitro* Angiogenesemodells wurde außerdem aufgezeigt, dass die kurzkettige Fettsäure auch die Bildung kapillarähnlicher tubulärer Strukturen, die

sogenannte *tube formation*, von HUVECs hemmt. Diese Beobachtungen werden bestätigt durch Untersuchungen von Michaelis *et al.*, die sich während der Entstehung dieser Arbeit mit der antiangiogenen Potenz von Valproat beschäftigten. Die Arbeitsgruppe demonstrierte darüberhinaus die angiogenesehemmenden Eigenschaften der Valproinsäure *in vivo*. Unter Einbeziehung der gleichzeitig beobachteten Hyperacetylierung des Histons H4 schlossen Michaelis *et al.* aus ihren Ergebnissen, dass die Valproinsäure angiogeneserelevante Parameter über einen Mechanismus hemmt, dem eine HDAC-Hemmung vorausgeht. Die Arbeitsgruppe vermutete, dass eine Abnahme der eNOS-Expression zugrunde liegt. Die genauen Mechanismen sind allerdings bislang noch unklar [271].

Wie die vorgestellten Daten weiter zeigen, bewirkte auch die kurzkettige Fettsäure Butyrat eine Hemmung der Zellproliferation von HUVECs. Auch auf die endotheliale Migration und auf die Bildung tubulärer Strukturen hatte Butyrat hemmenden Einfluss. In der Literatur findet sich kaum Vergleichsmaterial aus anderen Studien. Die Hemmung von Migration und *tube formation* unter Butyrateinfluss wurde bislang nur an *human intestinal microvascular endothelial cells* (HIMECs) beschrieben. Ogawa *et al.* führten die antiangiogene Wirkung von Butyrat auf eine Hemmung der COX-2 Expression und der Prostaglandinsynthese zurück [349]. Rössig *et al.* sahen die antiangiogenen Wirkungen des HDAC-Inhibitors Butyrat in einer Abnahme der NO-Generierung durch Endothelzellen und einer markanten Reduktion der eNOS Expression begründet [249], was möglicherweise zu der verringerten *tube formation* beiträgt.

Den zahlreichen Untersuchungen über die antiproliferative Wirkung von Trichostatin A (TSA) auf neoplastische und präneoplastische Zellen stehen nur wenige Untersuchungen zur antiangiogenen Potenz dieser natürlichen Hydroxaminsäure gegenüber. Ihre Bedeutung als potentieller Inhibitor der tumorinduzierten Angiogenese wurde erst vor kurzem erkannt [242;270]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde in Übereinstimmung mit einer Untersuchung von Kim *et al.* gezeigt, dass Trichostatin A die Proliferation und die Migration kultivierter Endothelzellen inhibiert. Von Kim *et al.* wurde ferner gezeigt, dass Trichostatin A das Invasionsvermögen kultivierter Endothelzellen hemmt und ihre Adhärenz an diverse Komponenten der extrazellulären Matrix (ECM) vermindert. Im Tierversuch (Lewis Lungenkarzinom-Modell) führte die Behandlung mit Trichostatin A – neben einer signifikanten Reduktion der Tumormasse – zu einer spezifischen Hemmung der tumorinternen Blutgefäßentwicklung [242]. Wie die vorliegenden Daten zeigen, wurde auch die Bildung tubulärer Strukturen von HUVECs im *in vitro* Angiogenese-Assay unter dem Einfluss von Trichostatin A verringert. Rössig *et al.* erzielten kürzlich ein entsprechendes

Ergebnis [249]. Von Deroanne *et al.* wurde demonstriert, dass die über Trichostatin A vermittelte HDAC-Hemmung sowohl die spontane als auch die wachstumsfaktorinduzierte Angiogenese unterdrückt. Die Arbeitsgruppe beschrieb die durch Trichostatin A vermittelte Hemmung der *tube formation* von Endothelzellen zusätzlich *in vivo*. Sie schloss aus ihren Ergebnissen, dass die Funktion von Trichostatin A als HDAC-Inhibitor dazu führt, dass Endothelzellen eine Resistenz gegenüber dem durch Wachstumsfaktoren wie VEGF vermittelten angiogenen Stimulus entwickeln [270]. Dagegen postulierten Rössig *et al.* für Trichostatin A – ähnlich Michaelis *et al.* für Valproat – dass diese Substanz endotheliale Zellfunktionen über eine HDAC-abhängige Regulation der eNOS Expression beeinflusst [249].

Die Wirkung der hier eingesetzten HDAC-Inhibitoren auf Proliferation, Migration und Endothelbildung von HUVECs kann aufgrund der einheitlichen Methodik der vorliegenden Arbeit vergleichend betrachtet werden. Die Zellproliferation betreffend wurden mit Valproat, Butyrat bzw. Trichostatin A in der jeweils höheren Konzentration [3mM bzw. 400 nM] mit einer Abnahme auf 12%-14% nach 24 Stunden bzw. 21%-24% nach 48 Stunden vergleichbare Ergebnisse erzielt. Die Migration von Endothelzellen wurde jeweils dosisabhängig gehemmt, wobei Butyrat eine stärkere Wirkung zeigte als Valproat. Trichostatin A erwies sich als der potenteste Inhibitor des Migrationsvermögens von HUVECs. Diese Tendenz wurde entsprechend bei der Ausbildung tubulärer Strukturen im *in vitro* Angiogenese-Assay beobachtet.

Wie die bisherigen Ausführungen gezeigt haben, befindet sich die Erforschung der antiangiogenen Wirkung von HDAC-Inhibitoren noch in den Anfängen. In den hier durchgeführten Untersuchungen wurden mit Trichostatin A – einem der potentesten Hemmstoffe von HDACs [314;316;317] – die vergleichsweise stärksten antiangiogenen Effekte erzielt. Dieses Ergebnis stützt die Hypothese, dass die Hemmung angiogeneserelevanter endothelialer Prozesse durch Valproat, Butyrat und Trichostatin A auf ihre Funktion als HDAC-Inhibitoren zurückzuführen ist. Die der HDAC-Hemmung zugrundeliegenden Wirkmechanismen sind derzeit noch unzureichend beschrieben. Neben den bereits erwähnten Überlegungen wurde eine Beeinflussung der VEGF Rezeptor Expression in Erwägung gezogen [270;349]. Andere Autoren vermuteten, dass die Angiogenesehemmung auf einer Inhibition von Histondeacetylasen, die Hypoxie-regulierte Tumorsuppressorgene unterdrücken, basiert. Daneben wird die Modulation verschiedener Signalwege diskutiert, im Besonderen eine Beeinflussung der HIF-1 $\alpha$  und VEGF/FGF-2

Signaltransduktion [242;266;349]. Diese Überlegung ist auch Bestandteil der vorliegenden Arbeit und wird in den folgenden Kapiteln ausführlicher diskutiert.

## 4.2 Caco-2 Zellkulturüberstände und Endothelzellfunktionen

Wie in Kapitel 1.2.1 erläutert, wird die Induktion der Angiogenese unter physiologischen Bedingungen durch das Gleichgewicht aus pro- und antiangiogen wirkenden Faktoren limitiert. Wird diese ausgeglichene Dynamik gestört – ein üblicher Prozess während der Karzinogenese – werden die Endothelzellen aktiviert und der Angiogeneseprozess initiiert. Um den während der Tumorentwicklung auftretenden nutritiven Mangel (s. Kap. 1.2.1.1) zu imitieren, wurden die Caco-2 Zellen für die sich anschließenden Untersuchungen zunächst mit serumreduziertem Medium kultiviert. Die vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass HUVECs, die anschließend mit diesen Caco-2 Zellkulturüberständen inkubiert wurden, eine hochsignifikante Steigerung der Proliferationsrate aufweisen. Dabei war der Proliferationszuwachs annähernd proportional zur Konditionierungsdauer des Mediums mit Caco-2 Zellen. Dieses Ergebnis lässt die Interpretation zu, dass der *angiogenic switch* (s. Kap. 1.2.1) ausgelöst wurde, möglicherweise durch eine gesteigerte Produktion proangiogener Mediatoren.

Im Gegensatz dazu führte die Inkubation von HUVECs mit Zellkulturüberständen von Caco-2 Zellen, die zuvor mit Valproat, Butyrat oder Trichostatin A behandelt wurden, zu einer dosisabhängigen und jeweils hochsignifikanten Hemmung der HUVEC-Proliferation. Diese Wirkung des Butyrat-konditionierten Mediums bestätigt eine frühere Untersuchung unserer Arbeitsgruppe [350]. Die Hemmung der endothelialen Zellproliferation durch Valproat- und TSA-konditionierte Medien konnte im Rahmen dieser Arbeit erstmals demonstriert werden. Die vergleichende Betrachtung ergab, dass die stärkste Proliferationshemmung der HUVECs durch Zellkulturüberstände von Caco-2 Zellen, die zuvor mit Butyrat inkubiert wurden, erzielt wurde. Ähnlich potent wirkten auch die Valproat-konditionierten Medien. Mit Trichostatin A inkubierte Caco-2 Überstände bewirkten eine etwas geringere Proliferationshemmung. Die Abhängigkeit von der Konditionierungsdauer von 12 Stunden über 24 Stunden bis 48 Stunden war deutlich zu erkennen.

Den Ergebnissen ist weiter zu entnehmen, dass neben der Proliferation auch andere angiogeneserelevante Zellfunktionen von HUVECs durch konditionierte Caco-2 Medien beeinflussbar sind. Die Migration der Endothelzellen durch die Mikroporen einer Polycarbonat-Membran wurde durch Inkubation mit Zellkulturüberständen von Valproat-

behandelten Caco-2 Zellen deutlich gehemmt. Die Caco-2 Überstände von Butyrat-behandelten Zellen zeigten eine noch stärker migrationshemmende Wirkung. Die vergleichsweise signifikanteste Hemmung endothelialer Migration wurde mit Trichostatin A - konditionierten Medien erreicht.

Desweiteren konnte gezeigt werden, dass auch die Ausbildung kapillarähnlicher tubulärer Strukturen durch Inkubation der HUVECs mit konditionierten Caco-2 Medien stark reduziert wird (mit einer der Migrationshemmung entsprechenden Tendenz).

Die vorliegenden Daten ermöglichen zusätzlich den Vergleich zwischen der unmittelbaren Wirkung der Substanzen und ihrer "indirekten" Wirkung über den Caco-2 Zellkulturüberstand. Den Ergebnissen ist zu entnehmen, dass das Ausmaß der Proliferationshemmung durch konditionierte Medien mit dem direkten Einfluss der jeweiligen Substanz – verglichen nach 24 Stunden Inkubationsdauer – tendenziell übereinstimmt. Die Inkubation der HUVECs mit Zellkulturüberständen von Butyrat [3 mM] - behandelten Zellen führte sogar zu einer stärkeren Hemmung der Zellproliferation als die Substanz selbst (Abnahme der Proliferation auf 10% vs. 19%). Die Effekte der konditionierten Medien auf die *in vitro* Endothelzellfunktionen Migration und *tube formation* waren ebenfalls etwa vergleichbar mit der direkten Substanzwirkung.

Die beschriebenen Wirkungen der Zellkulturüberstände auf die verschiedenen HUVEC-Funktionen sind wohl nicht auf eine etwaige Primärwirkung der Testsubstanzen zurückzuführen. Dies konnte zumindest für Butyrat [350] und Trichostatin A von unserer Arbeitsgruppe nachgewiesen werden [351].

In diesem Zusammenhang stellten sich folgende Fragen: welche Signalmoleküle, die offensichtlich von Caco-2 Zellen ausgesandt werden, zeigen stimulierende Wirkung auf endotheliale Funktionen? Ist es möglich, diese durch HDAC-Inhibitoren zu hemmen? Zwei in diesem Zusammenhang bekannte Faktoren wurden eingehender untersucht.

#### 4.2.1 FGF-2

Es wird schon lange vermutet, dass der *basic fibroblast growth factor* (FGF-2) durch seine angiogenen Eigenschaften eine wichtige Rolle bei Tumorwachstum und –neovaskularisierung spielt [29;46]. Gospodarowicz *et al.* vermuteten, dass das Signalpeptid durch Verstärkung der Endothelzellproliferation für ein beschleunigtes Einsproßen neugebildeter Kapillaren in ischämisches Tumorgewebe verantwortlich sein könnte. So würde FGF-2 dessen Versorgung mit nutritiven Substanzen sicherstellen und Metastasierung ermöglichen [103;352]. Erwiesenermaßen wird unter dem Einfluss von FGF-2 sowohl *in vitro* als auch *in vivo* die Migration von Endothelzellen und Gefäßmuskelzellen stimuliert [73;353;354]. Tumorangiogenese tritt insbesondere unter hypoxischen Bedingungen auf, die einen Stimulus für die Freisetzung von FGF-2 darstellen [355]. Dies konnte unter anderem an humanen Speicheldrüsenkarzinomzellen nachgewiesen werden [356]. Es wurde weiter gezeigt, dass durch experimentell erzeugte Ischämie die Kollateralgefäßbildung und die Neovaskularisierung ischämischen Gewebes beschleunigt werden [357]. Eine Assoziation zwischen FGF-2 und Blutgefäßneubildungen wurde auch bei verschiedenartigen Tumoren gefunden. Schweigerer *et al.* vermuteten, dass dieser Wachstumsfaktor für die Neovaskularisierung von Retinoblastomen verantwortlich ist. Sie konnten FGF-2 aus kultivierten humanen Retinoblastomzellen isolieren und seine mitogene Wirkung auf Endothelzellen nachweisen [110]. Bei Prostatakarzinomen konnte FGF-2 sogar als ein Schlüsselregulator der Angiogenese identifiziert werden [358].

Die Expression von FGF-2 durch neoplastische Zellen kann auch direkt auf Tumorebene Auswirkungen zeigen. Durch Steigerung der Sekretion verschiedener Proteasen und Kollagenasen kann FGF-2 Tumorinvasion und Metastasierung ermöglichen. Man vermutet desweiteren auch einen mitogenen Einfluss auf die Tumorzellen selbst [103].

FGF-2 wird von zahlreichen Tumorzelllinien *in vitro* verstärkt synthetisiert. Erhöhte FGF-2 Expression wurde z.B. in Endothelzellen des Kaposi Sarkoms [359] und in proliferierenden Hämangiomen gefunden [360], ebenso bei Glioblastomen [361], Ovarialtumoren [362] und Pankreaskarzinomen [363]. Bei oralen Plattenepithelkarzinomen wurde eine gesteigerte Produktion von FGF im Vergleich zu normaler Mucosa beschrieben [364;365]. Yamanaka *et al.* konnten nachweisen, dass erhöhte FGF-2 mRNA Expression in Pankreaskarzinomgewebe signifikant mit fortgeschrittenem Krankheitsstadium und verringerter Überlebenszeit korreliert [366].

Über die Funktion von FGF-2 in der Kolonkarzinogenese liegen derzeit nur wenige Daten vor. Das *FGF-binding protein* (FGF-BP) – welches immobilisiertes FGF aus der extrazellulären Matrix freisetzt – kann wie FGF-2 selbst als *angiogenic switch* Molekül in der Kolonkarzinogenese bezeichnet werden [31;367;368]. Es wird in verschiedenen humanen Kolonkarzinomzelllinien und -geweben verstärkt exprimiert [367]. Ray *et al.* demonstrierten, dass die FGF-BP Expression während der frühen Kolonkarzinogenese stark hochreguliert wird und mit einer Verstärkung der Angiogenese bei humanen Kolondysplasien korreliert. Die Arbeitsgruppe schlussfolgerte, dass dies auf eine verstärkte Freisetzung von FGF-2 zurückzuführen ist [369]. New *et al.* untersuchten die Auswirkungen des Wachstumsfaktors auf die Proliferation von Kolontumorzellen. Die exogene Zufuhr von FGF-2 in das Nährmedium verschiedener kultivierter Kolonkarzinomzellen resultierte in signifikanter Wachstumsstimulation. In derselben Studie konnte die Expression sowohl des FGF-2 Proteins als auch seiner Rezeptoren nachgewiesen werden. Dies führte zur Vermutung, dass FGF-2 in die autokrine Regulation des Kolontumorwachstums involviert ist [370]. Leith *et al.* demonstrierten am Nacktmausmodell, dass FGF-2 auch *in vivo* einen Mediator der Kolontumorprogression darstellt. Die Arbeitsgruppe untersuchte das Wachstumsverhalten transplanteder humaner DLD-2 Kolonkarzinome unter FGF-2 Behandlung. Sie konnte eine Steigerung des Tumorwachstums um den Faktor 1,5 beobachten [371]. Landriscina konnte zeigen, dass Patienten mit kolorektalen Neoplasien erhöhte Serumspiegel von FGF-2 aufweisen. Er bezeichnete FGF-2 als einen auslösenden Faktor des *switch* zum angiogenen Phänotyp [372].

#### 4.2.2 VEGF

Der *vascular endothelial growth factor* (VEGF) nimmt unter den bekannten proangiogenen Faktoren (s. Kap. 1.2.1.1) eine Sonderstellung ein. Dank seiner Potenz und seiner Spezifität für Endothelzellen gilt er als wichtigster Mediator der tumorassoziierten Angiogenese [115;373]. *In situ* Hybridisierungsstudien zeigten, dass die VEGF mRNA in der großen Mehrheit aller bisher untersuchten Tumore merklich hochreguliert wird. Zu diesen zählen unter anderem Tumore der Lunge [374], der Schilddrüse [375], der Niere und der Blase [376], Mammakarzinome [377] sowie verschiedene Gehirntumore [378;379]. Eine übermäßige Expression von VEGF fördert erwiesenermaßen die Tumorentwicklung und -progression [380]. Eine beschleunigte Tumorexansion in Korrelation mit erhöhten VEGF mRNA Werten

konnte beispielsweise durch *in vivo* Versuche mit der humanen Melanomzelllinie WM164 nachgewiesen werden [381].

VEGF wird von Tumorzellen sowohl exprimiert als auch sezerniert [382]. Ausgeschleuste Signalmoleküle wirken auf Zellen in der näheren Umgebung oder nach Transport zum Wirkort. VEGF mRNA wird in Tumorzellen, nicht jedoch in Endothelzellen exprimiert. Dies unterstützt die These, dass VEGF in erster Linie ein parakriner Mediator ist [383]. Das VEGF Protein konnte dagegen in immunhistochemischen Studien auch in Endothelzellen lokalisiert werden [379]. Dies deutet darauf hin, dass tumorabstammendes VEGF in den Zielzellen akkumuliert [384].

Von Tumorzellen produzierter VEGF stimuliert potent die endotheliale Zellproliferation [385]. Beispielsweise zeigten Endothelzellen, die mit VEGF-produzierendem Thyreoidalkarzinomgewebe assoziiert waren – im Gegensatz zu ruhendem Endothel gesunden Gewebes – intensive mitogene Aktivität [386]. Die angiogene Potenz von VEGF belegten auch Untersuchungen an Mammakarzinomen. Toi *et al.* beobachteten eine signifikante positive Korrelation zwischen der Stärke der intratumorösen VEGF Proteinkonzentration und dem Ausmaß der Vaskularisierung der Tumore [387]. VEGF trägt auch durch seine schon genannte permeabilitätssteigernde Wirkung zur Tumorprogression bei. Der Wachstumsfaktor induziert die Fenestration von Blutgefäßen [388] und die Produktion von kanalbildenden vesikulo-vakuolären Organellen [389]. Dadurch ermöglicht er Proteinen die Extravasation und trägt so zur Formierung einer extravaskulären Matrix bei. Diese unterstützt das Wachstum von Endothelzellen und Tumorzellen und erleichtert die Invasion von Stromazellen in den sich entwickelnden Tumor [390;391]. Die durch VEGF induzierte Porenbildung und Fenestration des Endothels konnte sowohl *in vitro* [392] als auch *in vivo* [388;393;394] beobachtet werden. Entsprechend konnte im Tierversuch durch VEGF-neutralisierende Antikörper die Permeabilität tumorassoziierter Gefäße reduziert werden [395].

Einen weiteren experimentellen Beweis der zentralen Bedeutung von VEGF für die effektive Tumorangio-genese lieferte ein *in vivo* Modell mit embryonalen Stammzellen (ES). Werden murine ES Zellen in Nacktmäuse injiziert, können sie hochvaskularisierte Teratokarzinome bilden. VEGF-Null ES Zellen waren in ihrer Fähigkeit, Tumore zu erzeugen, sehr stark eingeschränkt [156]. Es existieren Anhaltspunkte, dass bei Patienten mit hohem VEGF Gehalt im Tumorgewebe eine höhere Rezidivwahrscheinlichkeit besteht [396;397]. Linderholm *et al.* konnten in einer Studie mit an Brustkrebs erkrankten Patienten diese prognostische Relevanz von VEGF kürzlich bereits nachweisen [398]. Auch die Untersuchung von

Patientenserum auf die VEGF Konzentration erscheint geeignet zur Tumordiagnostik. In verschiedenen Studien wurde dargelegt, dass Tumorpationen höhere VEGF Serumspiegel aufweisen als die tumorfreie Vergleichsgruppe. Dies korrelierte zusätzlich meist mit einer ungünstigen Prognose [399-401].

Auch bei gastrointestinalen Tumoren wurde die Bedeutung von VEGF für die tumorinduzierte Angiogenese untersucht. Lobb *et al.* konnten bereits 1985 die Sekretion dieses angiogenen Faktors bei der humanen Kolonadenokarzinomzelllinie HT-29 nachweisen [121]. Eine spätere Studie von Brown *et al.* zeigte eine verstärkte Expression der VEGF mRNA in malignen Adenokarzinom-Epithelzellen – verglichen mit normalem Epithel, hyperplastischen Polypen sowie Adenomen. VEGF wurde ferner in entarteten Zellen in unmittelbarer Nachbarschaft zu nekrotischen Tumorarealen vermehrt exprimiert, ebenso von dort vereinzelt vorkommenden Stromazellen. In den zehn von der Arbeitsgruppe untersuchten Kolonkarzinomen wurde VEGF Protein nachgewiesen. Auch in Endothelzellen tumornaher stromaler Blutgefäße waren VEGF Protein und VEGF Rezeptor mRNA nachweisbar, nicht aber in entfernteren Blutgefäßen. Die Arbeitsgruppe schlussfolgerte, dass der Wachstumsfaktor zum Tumorwachstum beiträgt, indem er Angiogenese und Stromaformation fördert – direkt durch Induktion der Endothelzellproliferation sowie indirekt durch Erhöhung der vaskulären Permeabilität [402].

Cheung *et al.* konnten eine signifikant erhöhte Expression von VEGF<sub>121</sub> und VEGF<sub>165</sub> bei Kolonkarzinomen nachweisen. Sie vermuteten einen kausalen Zusammenhang zwischen der Expression dieser löslichen VEGF-Isoformen und dem *angiogenic switch* in der Tumorprogression [403]. Eine entsprechende Aussage zur Bedeutung von VEGF für die Tumorprogression trafen Wong *et al.*. Die Arbeitsgruppe detektierte vergleichbare Expressionsmuster von VEGF bei *in situ* und invasiven Komponenten des gleichen kolorektalen Adenokarzinoms. Sie folgerte, dass die Aktivierung von VEGF – hier im besonderen in der prämaligen Phase der Entwicklung kolorektaler Tumore – die molekulare Basis für die Induktion der Angiogenese darstellt [404]. Auch Yan *et al.* proklamierten die Notwendigkeit von VEGF für die Angiogenese von Kolontumoren. Sie konnten am transplantierten Kolonadenokarzinom darlegen, dass die Permeabilität und Dichte der tumorassoziierten Gefäße mit dem Vorkommen von VEGF korreliert [395]. Neben der Produktion des stimulierenden Faktors ist auch die Expression eines aktivierbaren Rezeptors Voraussetzung für seine Wirkungsentfaltung. Takahashi *et al.* untersuchten humane Kolonadenome und -karzinome. Die Arbeitsgruppe konnte dokumentieren, dass

metastasierende Neoplasien – verglichen mit nicht metastasierenden Tumoren – sowohl VEGF als auch den VEGF Rezeptor KDR verstärkt exprimieren. Dies korrelierte unmittelbar mit dem Ausmaß der Neovaskularisierung sowie der Proliferationsrate der Tumorzellen [405]. Warren *et al.* gelang es, am Nacktmausmodell zu demonstrieren, dass VEGF einen Mediator von Wachstum und Metastasierung humaner Kolonkarzinomzellen *in vivo* darstellt. Die Arbeitsgruppe konnte die VEGF-Rezeptoren KDR und Flt-1 in verschiedenen humanen Kolonkarzinomzelllinien nachweisen. Dies gelang ebenso in von Kolonkarzinomen abstammenden Lebermetastasen. Die Behandlung athymischer Mäuse mit Antikörpern gegen VEGF resultierte in einer zeit- und dosisabhängigen Wachstumshemmung subkutaner Xenotransplantate. Auch experimentell erzeugte Lebermetastasen wurden in Zahl und Größe merklich reduziert. Die Arbeitsgruppe schlussfolgerte, dass VEGF ein üblicher angiogener Faktor bei humanen kolorektalen Lebermetastasen ist. Sie postulierte, dass eine Modulation der VEGF Genexpression oder der VEGF Aktivität eine potentiell sehr effektive antineoplastische Therapie kolorektaler Neoplasien darstellt [406].

Auch klinische Studien weisen darauf hin, dass VEGF als vorherrschender angiogener Faktor humaner Kolonneoplasien anzusehen ist und für die Tumordiagnostik eine besondere Rolle spielen könnte. Beispielsweise konnte die Neigung zur Progression von kolorektalen Tumoren – und zum frühen Rezidiv – signifikant mit der Expression von VEGF im Tumorgewebe assoziiert werden [407]. Landriscina *et al.* zeigten, dass bei Patienten mit kolorektalen Neoplasien Tumor- und Serumspiegel von VEGF signifikant mit dem Krankheitsstadium korrelierten [372]. Eine weitere Arbeitsgruppe untersuchte die VEGF Serumspiegel von Patienten mit kolorektalen Karzinomen (Stadium I bis IV). Die Ergebnisse bestätigten deren prognostische Relevanz bezüglich der Überlebensrate [408]. In einer neuen Studie wurde auf die Möglichkeit hingewiesen, die Messung präoperativer VEGF Serumspiegel als prognostisches Mittel vor einer chirurgischen Therapie einzusetzen. Diese waren bei Patienten, bei denen es nach der Behandlung zur Genesung kam, signifikant niedriger als die nicht geheilter Patienten [409].

#### **4.2.3 Wirkung von Valproat, Butyrat und Trichostatin A auf FGF-2 und VEGF**

Über den Einfluss von HDAC-Inhibitoren auf die Wachstumsfaktoren FGF-2 und VEGF liegen nur vereinzelte Daten vor. Die vorgestellten Ergebnisse zeigen erstmals, dass die Behandlung von Tumorzellen mit Valproat in einer Abnahme der FGF-2 Proteinexpression

resultiert. Gleiches gilt für den hemmenden Einfluss von Valproat auf die Sekretion, die Protein- sowie mRNA Expression von VEGF. Butyrat wurde erst kürzlich als antiangiogene Substanz identifiziert [410;411]. Es existieren bisher keine Studien, die die Wirkung dieses HDAC-Inhibitors auf die Expression von FGF-2 darstellen. Eine von Lambrecht *et al.* durchgeführte Untersuchung zeigte, dass die Behandlung von MCF-7 Mammakarzinomzellen mit Butyrat zu einer selektiven Abnahme der Ansprechbarkeit auf die durch FGF-2 vermittelte Wachstumsstimulation führt. Außerdem ließ sich zeigen, dass die Behandlung von Mammakarzinomzellen mit Butyrat zu einer verstärkten Bindung von FGF-2 an Heparansulfatproteoglykane (HSPGs) führt [412].

In vorliegender Arbeit konnte gezeigt werden, dass Butyrat die Proteinexpression von FGF-2 in Caco-2 Zellen signifikant hemmt, z.T. bis zu 80%. Wie in Kapitel 1.2.2.1 beschrieben, bleibt FGF-2 ohne die Aktivität Heparansulfat-abbauender Enzyme membrangebunden. Die von Lambrecht *et al.* beschriebene verstärkte Bindung von FGF-2 an HSPGs unter Butyrat-Einfluss [412] könnte den Proteintransport aus der Zelle möglicherweise erschweren und zu der hier gezeigten Abnahme von freiem FGF-2 Protein beitragen.

Verschiedene Autoren führen die antiangiogene Wirkung von Butyrat zunehmend auf eine Regulation bzw. Hemmung des Wachstumsfaktors VEGF zurück. Bei verschiedenartigen Glioblastomzelllinien konnten Sawa *et al.* eine Hemmung sowohl der mRNA Expression als auch der Sekretion von VEGF durch Butyrat beobachten. Die Autoren postulierten, dass Butyrat bei Glioblastomgewebe als potentieller Angiogenese-Inhibitor anzusehen ist [413]. Eine Studie von Pellizarro *et al.* zeigte, dass Butyrat bei der Kolonadenokarzinom-Zelllinie HT29 dosisabhängig zu einer verminderten VEGF165 Sekretion führt. Auch die Proteinexpression wurde reduziert. Die mRNA-Werte dieser VEGF Isoform wurden in dieser Zelllinie unter Butyratbehandlung dagegen kaum beeinflusst [272]. Bei der Zelllinie Caco-2 konnte in einer vorherigen Arbeit unserer Arbeitsgruppe eine VEGF165-Sekretionshemmung durch Butyrat [2 mM] ermittelt werden [350]. Hier konnte demonstriert werden, dass bereits eine geringere Butyratkonzentration [1 mM] zu einer hochsignifikanten Abnahme der VEGF Sekretion führt. Zusätzlich zeigen die hier vorgestellten Ergebnisse erstmals, dass Butyrat in Kolonkarzinomzellen (Caco-2) neben der Sekretion auch die Expression von VEGF sowohl auf Protein- als auch auf mRNA-Ebene z.T. signifikant hemmte.

Über die Wirkung des HDAC-Inhibitors Trichostatin A auf die Expression von FGF-2 sind in der Literatur derzeit keine Daten zu finden. Dies ist insofern bemerkenswert, als dass er sich in den hier durchgeführten Untersuchungen zu allen untersuchten Inkubationszeiten als stärkster Hemmstoff der FGF-2 Expression herausgestellt hat.

Den Wachstumsfaktor VEGF betreffend konnten Sawa *et al.* – entsprechend ihren Ergebnissen mit Butyrat – die mRNA Expressions- und Sekretionshemmung durch Trichostatin A an verschiedenen Glioblastomzelllinien beobachten. Sie schlossen, dass neben Butyrat auch Trichostatin A antiangiogen auf Glioblastomgewebe wirken könnte [413]. An HepG2 Zellen wurde unter Trichostatin A-Behandlung eine verminderte VEGF-Proteinexpression erzielt [242]. In Analogie zu diesen Daten ließ sich in den hier vorgestellten Untersuchungen erstmals eine Modulation der VEGF Sekretion und Expression durch Trichostatin A an Kolonkarzinomzellen demonstrieren. Zusammenfassend zeigen die vorliegenden Untersuchungsergebnisse, dass alle untersuchten HDAC-Inhibitoren potente Hemmstoffe von FGF-2 und VEGF darstellen. Butyrat übte sowohl auf die FGF-2 Proteinexpression als auch auf die Sekretion und Expression von VEGF einen stärker hemmenden Einfluss aus als Valproat. Trichostatin A erwies sich – verglichen mit Valproat und Butyrat – als stärkster Inhibitor dieser proangiogenen Wachstumsfaktoren.

### 4.3 Bedeutung von HIF-1 $\alpha$

Wiederholt nachgewiesen wurde eine positive Korrelation zwischen erniedrigtem Sauerstoffpartialdruck, der Expressionsrate des *hypoxia inducible factors* (HIF-1 $\alpha$ ) und dem Vaskularisierungsgrad maligner Tumore [49;50;414]. Dieser Zusammenhang ließ sich z.B. bei Tumoren des Pankreas zeigen [415]. Vielfach wurde angenommen, dass HIF-1 $\alpha$  ausschließlich unter hypoxischen Bedingungen exprimiert wird. Wie die vorliegenden Daten zeigen, wurde bei der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 unter normoxischen Versuchsbedingungen eine HIF-1 $\alpha$  Proteinexpression detektiert. In neuen immunhistochemischen Untersuchungen von verschiedenen Organen bei Mäusen konnte das HIF-1 $\alpha$  Protein ebenfalls unter normoxischen Umgebungsbedingungen nachgewiesen werden [416]. Diese Beobachtungen unterstützen die Vermutung von Iyer *et al.*, dass eine bestimmte HIF-1 $\alpha$  Konzentration stets notwendig ist – insbesondere um eine kontinuierliche Expression von Genen sicherzustellen, die für eine ausreichende Energiebereitstellung zur Aufrechterhaltung der normalen Zellfunktion unentbehrlich sind [417].

HIF-1 $\alpha$  induziert die Expression des derzeit bedeutendsten angiogenen Faktors VEGF. Der Transkriptionsfaktor fungiert hierbei als Bindeglied zwischen intratumoraler Hypoxie – die in jedem Fall zu einer Expressionssteigerung des Transkriptionsfaktors führt – und der tumorinduzierten Angiogenese [50;414].

Kürzlich gelang Kuwai *et al.* der Nachweis, dass das Zusammenwirken von HIF-1 $\alpha$  und VEGF auch die Angiogenese humaner kolorektaler Karzinome beeinflusst. Die Arbeitsgruppe stellte, sowohl in der Zellkultur als auch am Bioptat, eine positive Korrelation zwischen den HIF-1 $\alpha$  Protein und den VEGF mRNA Werten fest. Die erhöhte HIF-1 $\alpha$  Expression war assoziiert mit venöser Invasion, verstärkter Tumorausbreitung und intensivierter Neovaskularisierung. Dies wurde als Hinweis auf einen möglichen Beitrag von HIF-1 $\alpha$  zum Tumorwachstum *in vivo* gewertet. Zusätzlich konnte in dieser Studie eine prognostische Relevanz von HIF-1 $\alpha$  und VEGF bei Kolonkarzinompatienten ermittelt werden. Die Autoren postulierten, dass HIF-1 $\alpha$  als potentielles Zielmolekül einer antiangiogenen Therapie kolorektaler Karzinome anzusehen ist [171]. Die aktuellste Studie, die die Angiogenese kolorektaler Tumore thematisierte, ermittelte einen jeweils signifikanten positiven Zusammenhang zwischen erniedrigtem pO<sub>2</sub> und der HIF-1 $\alpha$  Expression auf mRNA und Proteinebene bzw. Hypoxie und der Proteinexpression von VEGF. Desweiteren zeigten die Proteinwerte von HIF-1 $\alpha$  und VEGF eine signifikante Korrelation mit der tumorinternen Gefäßdichte. Die Expressionsrate von HIF-1 $\alpha$  war ferner mit dem Malignitätsgrad der Neoplasien assoziiert. Die Arbeitsgruppe postulierte, dass HIF-1 $\alpha$  für die Regulation von VEGF verantwortlich ist und für die Tumorangiogenese sowie -progression eine entscheidende Rolle spielt [418].

Erst kürzlich wurde erkannt, dass HIF-1 $\alpha$  neben der VEGF Expressionssteigerung auch die Induktion der FGF-2 Expression in Tumorzellen vermittelt und so einen weiteren Beitrag zur Angiogenese leisten könnte [419]. In einer aktuellen Untersuchung von Bos *et al.* war bei invasiven Mammakarzinomen die HIF-1 $\alpha$ -vermittelte Angiogeneseinduktion mit einer Überexpression des Wachstumsfaktors FGF-2 assoziiert [420]. Im Tierversuch konnte demonstriert werden, dass unter hypoxischen Bedingungen sowohl die Expression von VEGF als auch die Expression von FGF-2 über eine Stabilisierung von HIF-1 $\alpha$  induziert wird [421].

#### **4.3.1 Hemmung von HIF-1 $\alpha$**

Es konnte bereits gezeigt werden, dass sich das Fehlen bestimmter Komponenten des HIF-1 $\alpha$  Signalweges auf angiogene Prozesse und die Tumorprogression auswirkt: so hatte der Verlust der HIF-1 $\alpha$  Aktivität drastische Effekte auf Tumorwachstum, Tumervaskularisierung und -energiemetabolismus [49;422-424]. Maxwell *et al.* zeigten, dass Hepatomzellen mit fehlerhafter HIF-1 $\beta$  Untereinheit keinen funktionellen HIF-1 Komplex bilden konnten. Nach

subkutaner Transplantation dieser Zellen war ein praktisch vollständiger Verlust der perinekrotischen VEGF Genexpression festzustellen. Dies war assoziiert mit merklich reduzierter Tumorangiogenese und verringerten Wachstumsraten [425]. Die Expression eines Peptides, das die HIF-1 $\alpha$  Transkription antagonisiert, hatte bei transplantierten humanen Mamma- und Kolonkarzinomzellen eine ähnliche Abnahme von Wachstum und vaskulärer Dichte zur Folge [422]. In HIF-1 $\alpha$  *knock-out* Experimenten wurde ein verringerter Gefäßdurchmesser und eine Zunahme avaskulärer Zonen beobachtet [255]. Auch die Hemmung der HIF-1 $\alpha$ -nachgeschalteten VEGF Expression bzw. der VEGF Rezeptorfunktion verringerte drastisch das Tumorwachstum, die Invasion und die Metastasierung in verschiedenen Tierversuchen [426-428].

Unter Berücksichtigung dieser Erkenntnisse stellt die Entwicklung eines HIF-1 $\alpha$  Inhibitormodells einen vielversprechenden Ansatzpunkt zur Hemmung der tumorinduzierten Angiogenese dar. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurde daher der Einfluss von Valproat, Butyrat und Trichostatin A auf verschiedene Regulationsmechanismen des Transkriptionsfaktors HIF-1 $\alpha$  untersucht.

Wie die vorgestellten Ergebnisse zeigen, wird die HIF-1 $\alpha$  Proteinexpression im Zelllysat von Caco-2 Zellen durch alle eingesetzten Behandlungssubstanzen zeit- und dosisabhängig induziert. Die höchsten HIF-1 $\alpha$  Proteinwerte wurden durchweg nach jeweils 12- und 24-stündiger Inkubation detektiert. Die Inkubation mit Butyrat bewirkte die vergleichsweise stärkste Expressionssteigerung, gefolgt von Trichostatin A und Valproat. Im Zusammenhang mit der geschilderten Bedeutung von HIF-1 $\alpha$  im Angiogeneseprozess und der hier gezeigten Hemmung von VEGF durch die Behandlungssubstanzen erscheinen diese Daten zunächst widersprüchlich. Sie bestätigen allerdings eine in Teilbereichen ähnliche Studie von Pellizzaro *et al.*. Hier wurde bei HT-29 Zellen nach Inkubation mit Butyrat eine gesteigerte HIF-1 $\alpha$  Proteinexpression bei gleichzeitiger Hemmung der VEGF Expression beschrieben. Die Autoren postulierten, dass die VEGF Synthese zumindest teilweise durch einen von HIF-1 $\alpha$  unabhängigen Mechanismus reduziert wird [272]. Die folgenden Ausführungen weisen darauf hin, dass diese Schlussfolgerung von Pellizzaro *et al.* mehr als in Frage zu stellen ist. Wie den vorgestellten Ergebnissen zu entnehmen ist, wurde die nukleäre Aktivität von HIF-1 $\alpha$  im Zelllysat von Caco-2 Zellen durch die hier eingesetzten Substanzen reduziert. Dabei bewirkte die Inkubation mit Valproat eine über den Untersuchungszeitraum relativ konstante Hemmung der Aktivität des HIF-1 $\alpha$  Proteins in der nukleären Fraktion. Die Inkubation mit Butyrat und Trichostatin A resultierte in einer zeitlich schwankenden, teilweise aber stärkeren

Hemmung der HIF-1 $\alpha$  Aktivität. Eine frühere diesbezügliche Untersuchung unserer Arbeitsgruppe unter Verwendung von Butyrat ergab ein für diese Substanz vergleichbares Ergebnis. Darüber hinaus wurde mittels Immunfluoreszenzanalysen gezeigt, dass nach Butyratbehandlung das HIF-1 $\alpha$  Protein im Zytoplasma von Caco-2 Zellen akkumuliert; im Gegensatz zu unbehandelten Zellen konnte im Nukleus kein HIF-1 $\alpha$  Protein detektiert werden. Wir postulierten, dass Butyrat möglicherweise die nukleäre Translokation von HIF-1 $\alpha$  unterdrückt [350].

Normalerweise wird der Transkriptionsfaktor nach seiner intrazellulären Stabilisierung in den Zellkern transportiert (s. Kap. 1.2.3). Hierbei handelt es sich um einen von der konstitutiv im Zellkern vorhandenen HIF-1 $\beta$  Untereinheit unabhängigen Vorgang [429]. Die genauen Regulationsmechanismen der nukleären Translokation von HIF-1 $\alpha$  sind allerdings noch nicht geklärt. Auch ist noch weitgehend unbekannt, welche Rolle dieser Prozess in der Stabilisierung des Proteins spielt. Richard *et al.* und Tanimoto *et al.* stellten die Vermutung auf, dass die nukleäre Translokation von HIF-1 $\alpha$  einen regulatorischen Schritt darstellt, durch den sich HIF-1 $\alpha$  der proteasomalen Degradierung entzieht [430;431]. Nach Kallio *et al.* wird die nukleäre Translokation des HIF Proteins durch Hypoxie induziert [432]. Dies widerspricht den Ergebnissen einer anderen Arbeitsgruppe, die zeigte, dass in HIF-1 $\alpha$  stark überexprimierenden, aber normoxisch kultivierten Zelllinien der Transport von HIF-1 $\alpha$  in den Zellkern funktioniert [433]. Demnach ist offensichtlich kein weiteres hypoxieabhängiges Signal für die nukleäre Translokation von HIF-1 $\alpha$  erforderlich. Nach einer Untersuchung von Liu *et al.* scheint die Phosphorylierung des HIF-1 $\alpha$  Proteins eine Voraussetzung für diesen Prozess zu sein [434].

Auch wenn die genauen Mechanismen ungeklärt bleiben müssen, lassen sich die hier gefundenen Resultate möglicherweise auf eine Inhibition der nukleären Translokation von HIF-1 $\alpha$  zurückführen. Damit könnte man zum einen die Zunahme des HIF-1 $\alpha$  Proteins im Zelllysate der Caco-2 Zellen erklären. Andererseits erscheint so auch die verminderte nukleäre Aktivität von HIF-1 $\alpha$  plausibel, da die nukleäre Lokalisation von HIF-1 $\alpha$  für die Aktivierung des Proteins unerlässlich ist [434].

#### **4.3.2 Proteasomaler Abbauweg**

Es finden sich zunehmend Hinweise darauf, dass in der Regulation zahlreicher Transkriptionsfaktoren der Abbau über das Ubiquitin-Proteasom-System eine kritische Rolle

spielt. Von Huang *et al.* konnte gezeigt werden, dass auch die O<sub>2</sub>-abhängige Proteolyse von HIF-1 $\alpha$  über diesen Signalweg vermittelt wird [345] (s. Abb. 4.1).

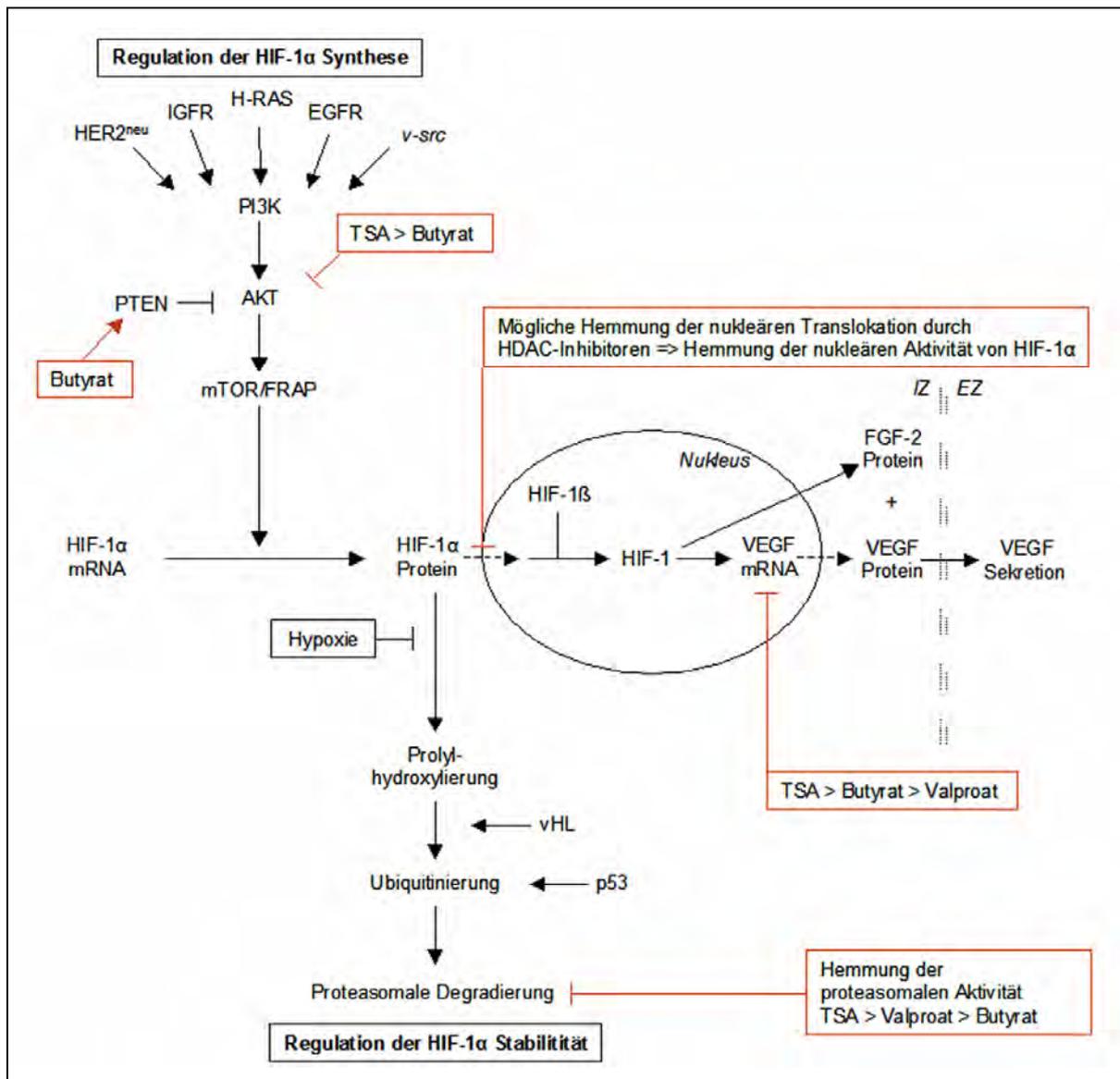
Wie in Kapitel 1.2.3 erläutert, wird HIF-1 $\alpha$  unter physiologischen Bedingungen innerhalb weniger Minuten abgebaut. Hypoxische Bedingungen in nekrotischen Tumorarealen schränken die O<sub>2</sub>-abhängige Prolylhydroxylierung von HIF-1 $\alpha$  ein. Infolgedessen wird die Bindung des Tumorsuppressor Proteins von Hippel-Lindau (pVHL) verhindert, die Ubiquitinierung von HIF-1 $\alpha$  unterdrückt und das nicht markierte Protein vom Proteasom nicht erkannt. Berücksichtigt man diese Regulationsmechanismen des proteasomalen Abbaus, wäre unter normoxischen Bedingungen – wie sie in den durchgeführten Experimenten herrschten – wohl auch trotz gesteigerter Proteinexpression ein rascher Abbau von HIF-1 $\alpha$  zu erwarten. Es wurde bereits erwähnt, dass die Behandlung der Caco-2 Zellen mit Valproat, Butyrat und Trichostatin A allerdings eine deutliche Akkumulation des Transkriptionsfaktors im Zelllysatz zur Folge hatte. Nun stellte sich die Frage, ob dies möglicherweise auf eine erhöhte Proteinstabilität infolge einer verminderten proteasomalen Degradierung zurückzuführen ist.

Die kritische Protease dieses katabolischen Systems ist das 26S Proteasom. Es handelt sich um einen ATP-abhängigen proteolytischen Komplex, der durch die Assoziation des tonnenförmigen 20S Proteasoms und zwei regulatorischen 19S Komponenten gebildet wird. Das katalytische Zentrum des Proteasom-Komplexes ist das 20S Proteasom. Die Aktivität dieses 20S Proteasoms wurde im Rahmen dieser Arbeit untersucht.

Den vorliegenden Ergebnissen ist zu entnehmen, dass sowohl Butyrat als auch Valproat und Trichostatin A die proteasomale Aktivität im Caco-2 Zelllysatz z.T. signifikant verminderten. Vergleichend betrachtet erwiesen sich die Substanzen nach 24-stündiger Inkubationsdauer als gleichwertig potente Hemmstoffe. Nach 48-stündiger Inkubation wurde die proteasomale Aktivität durch Trichostatin A am stärksten reduziert.

Da bereits mehrfach belegt wurde, dass eine Hemmung der proteasomalen Degradierung von HIF-1 $\alpha$  eine gesteigerte Stabilität des Transkriptionsfaktors im Zytosol zur Folge hat [169;345;435], könnte aus diesen Daten folgendes geschlossen werden: der hier gezeigten deutlichen zytoplasmatischen Akkumulation des HIF-1 $\alpha$  Proteins liegt eine Inhibition der proteasomalen Degradierung durch die Behandlungssubstanzen zugrunde.

Oikawa *et al.* unterstrich die Bedeutung des Proteasoms in der Angiogenese. In ihren Untersuchungen führte die Behandlung mit Lactacystin – einem spezifischen Hemmstoff des Proteasoms – zu einer nahezu vollständigen Hemmung der *in vivo* Neovaskularisierung. Lactacystin hemmte die endotheliale *tube formation*. Desweiteren verhinderte Lactacystin die Produktion des Plasminogenaktivators.



**Abbildung 4.1** Die Regulation der HIF-1 $\alpha$  Aktivität und die mögliche Beeinflussung durch HDAC-Inhibitoren in Caco-2 Zellen (modifiziert nach Semenza 2002 [170]; EGFR, epidermal growth factor receptor; EZ, extrazellulär; FRAP, FKBP-rapamycin associated protein, mTOR; HIF-1 $\alpha$ , hypoxia inducible factor-1 $\alpha$ ; IGFR, insulin-like growth factor-1 receptor; IZ, intrazellulär; PI3K, Phosphatidylinositol 3-Kinase; VEGF, vascular endothelial growth factor; p53, vHL (von Hippel-Lindau), PTEN: Tumorsuppressorgene; v-src, HER2<sup>neu</sup>: Onkogene; TSA, Trichostatin A).

Dieses Enzym ist für die Angiogeneseinduktion durch Endothelzellen mitverantwortlich. Die Arbeitsgruppe ermittelte eine Korrelation mit der Suppression intrazellulärer proteasomaler Aktivität. Sie postulierte, dass das Proteasom als Schlüsselregulator der *in vitro* und *in vivo* Angiogenese agiert; die antiangiogene Wirkung des Lactacystins wurde auf seine Funktion als spezifischer Hemmstoff des Proteasoms zurückgeführt [436].

#### 4.4 Die PI3-Kinase/AKT Signaltransduktionskaskade

Im Gegensatz zur Regulation der HIF-1 $\alpha$  Degradierung erfolgt die Synthese des Transkriptionsfaktors unabhängig vom pO<sub>2</sub> (s. Kap. 1.2.3). Ein wichtiger Signaltransduktionsweg wird hierbei über die Phosphoinositol 3-Kinase (PI3-Kinase/PI3K) und ihren nachgeschalteten Mediator, die Serin/Threonin Kinase AKT (Proteinkinase B), vermittelt (s. Abb. 4.1).

Es gilt als gesichert, dass eine gesteigerte Aktivität des PI3K/AKT Signalweges einen üblichen Mechanismus der Karzinogenese darstellt. Mehrfach konnte gezeigt werden, dass PI3K bzw. AKT in bestimmten Tumoren übermäßig exprimiert wird [437-440]. Durch Inhibition proapoptotischer Signale und Induktion der Zellzyklusprogression führt die PI3K/AKT Aktivierung zu einer Zelltothemmung [441-443] und trägt so zu der malignen Transformation der Zellen bei [444]. Dagegen führt die Hemmung des PI3K/AKT Weges zu einem Zellzyklusstopp und zur Differenzierungsinduktion in bestimmten Zellarten. Zu diesen zählen auch die humanen Kolonkarzinomzelllinien HT29 und Caco-2 [440].

Inzwischen finden sich zunehmend Hinweise in der Literatur, die einen Zusammenhang zwischen der PI3K/AKT Signalkaskade und der Angiogenese herstellen [48;165;445;446].

Es wurde sogar postuliert, dass dieser Signalweg als primärer Mediator der Angiogenese und Karzinogenese anzusehen ist [447]. An verschiedenartigen Karzinomzelllinien wurde gezeigt, dass die Aktivierung des PI3K/AKT Signaltransduktionsweges zu einer gesteigerten Expression des HIF-1 $\alpha$  Proteins führt [48;172]. Jiang *et al.* konnten belegen, dass die konstitutive Aktivität des PI3K/AKT Signalweges die VEGF Expression in Endothelzellen vermittelt [446]. Die direkte Korrelation zwischen der Aktivität des PI3K/AKT Signalweges, der HIF Expression, der HIF-1 vermittelten Transkription und der VEGF Expression wurde an humanen Prostatakarzinomzellen bereits eindeutig belegt [165]. Diese Beobachtungen lassen den Schluss zu, dass die durch Aktivierung der PI3K/AKT-Signalkaskade induzierte Angiogenese über eine Regulation von HIF-1 $\alpha$  und nachfolgend VEGF vermittelt wird.

Es gibt bereits einige Arbeiten, die darauf hinweisen, dass über eine Inhibition der PI3K/AKT Signalkaskade eine Angiogenesehemmung zu erzielen ist [445;447-449]. Im Rahmen dieser Arbeit wurde zunächst der Einfluss von Valproat, Butyrat und Trichostatin A auf die Proteinexpression von PI3K in Caco-2 Zellen untersucht. Mittels Western Blot konnte gezeigt werden, dass die Expression der regulatorischen Untereinheit p85 der PI3-Kinase durch Inkubation mit Butyrat nicht merklich beeinflusst wird. Dieses Ergebnis stimmt mit einer Untersuchung von Wang *et al.* überein. Die Arbeitsgruppe zeigte an HT29 Zellen, dass die

PI3K Proteinexpression unter Butyratbehandlung unverändert blieb [440]. Die vorliegenden Daten zeigen, dass auch Valproat und Trichostatin keine erkennbare Modulation der PI3K Expression bewirkten. Daher war das der PI3-Kinase nachgeschaltete Signalmolekül, die Proteinkinase B, nächstes Ziel der Untersuchungen. Wie den vorgestellten Ergebnisse zu entnehmen ist, wurde die Expression der nicht-phosphorylierten Form der Proteinkinase B weder durch Valproat, noch durch Butyrat oder Trichostatin A beeinflusst. Andere Ergebnisse wurden für die Expression der phosphorylierten und dementsprechend aktivierten Form der AKT-Kinase (pAkt) erzielt. Die Inkubation mit Trichostatin A führte zu einer signifikanten und dosisabhängigen Abnahme der pAkt Proteinexpression. Auch die Inkubation mit Butyrat führte zu einer deutlichen dosisabhängigen Reduktion des phosphorylierten AKT Proteins. Dagegen hatte die Behandlung der Caco-2 Zellen mit Valproat offensichtlich keinen Einfluss auf die Proteinwerte der aktiven Form der Proteinkinase B. Übereinstimmend mit diesem Ergebnis wurde auch in anderen Arbeiten gezeigt, dass Valproat keinen hemmenden Einfluss auf die Phosphorylierung von AKT ausübt [450-452]. Valproat beeinflusste also in Caco-2 Zellen weder die Proteinexpression der PI3-Kinase noch die Proteinexpression von AKT oder p-Akt. Dennoch kann nicht ausgeschlossen werden, dass Valproat in die Signaltransduktion der PI3K/AKT-Kaskade eingreift. Hierzu wären allerdings weitere Untersuchungen, beispielsweise zur Wirkung auf die mTOR/FRAP Expression, nötig.

Für Butyrat und Trichostatin A ist dagegen eindeutig erkennbar, dass die Substanzen Modulationen an dem der PI3-Kinase nachgeschalteten Signalmolekül AKT bewirken. Möglicherweise spielen aber auch noch weitere Faktoren eine Rolle in dieser Signaltransduktion. Dies scheint zumindest für Butyrat wahrscheinlich: von Wächtershäuser *et al.* wurde gezeigt, dass Butyrat selektiv zu einer Expressionssteigerung des *peroxisome proliferator activated receptor  $\gamma$*  (PPAR $\gamma$ ) in Caco-2 Zellen führt [453]. Dieser ligandenaktivierte nukleäre Rezeptor stellt einen bedeutenden Regulator zellulärer Prozesse dar. Zu seinen Funktionen zählen unter anderem die Wachstumshemmung und/oder die Differenzierungsinduktion von Adipozyten, Monozyten und Tumorzellen [454-457], was auch an der Kolonkarzinomzelllinie Caco-2 nachgewiesen wurde [453].

Panigrahy *et al.* demonstrierten erstmals, dass PPAR $\gamma$  in Tumorendothelien in hohem Maße exprimiert wird und hier durch seine Liganden aktiviert werden kann. Es wurde gezeigt, dass PPAR $\gamma$  Liganden die durch Wachstumsfaktoren induzierte Proliferation von Endothelzellen hemmen oder Apoptose *in vitro* vermitteln können [458]. Darüberhinaus wurde von Goetze *et al.* nachgewiesen, dass die PPAR $\gamma$  Aktivierung auch die endotheliale Migration inhibiert [459]. Weiter wurde gezeigt, dass die Ligandenbindung durch direkte und indirekte

antiangiogene Effekte eine Hemmung von Tumorwachstum und -metastasierung bewirkte [458]. Denkbar wäre daher, dass die im Rahmen dieser Arbeit gezeigten antiangiogenen Wirkungen von Butyrat teilweise auch über eine Expressionssteigerung von PPAR $\gamma$  vermittelt wurden. Die Aktivierung dieses nukleären Rezeptors führt nachweislich zu einer Expressionssteigerung von Phosphatase und Tensin Homologe deletiert an Chromosom 10 (PTEN). Dieses Tumorsupressorprotein dephosphoryliert die Produkte der PI3K-Reaktion und wirkt so hemmend auf den PI3K/AKT Signalweg [165;177]. Über nachfolgende Inhibition der HIF-1 $\alpha$  Synthese bzw. VEGF/FGF-2 Hemmung wäre so der Bezug zur Angiogenesehemmung herzustellen. Es bedarf allerdings weiterer Untersuchungen, um die genaue Rolle von PPAR $\gamma$  in diesem Zusammenhang zu definieren.

## 5 ZUSAMMENFASSUNG

Die Angiogenese ist von essentieller Bedeutung für das Wachstum und die hämatogene Metastasierung solider Tumore. Ihre Hemmung stellt eine vielversprechende Methode der Tumorthherapie dar. Es werden zunehmend Hinweise dafür gefunden, dass Hemmstoffe von Histondeacetylasen (HDACs) antiangiogene Potenz besitzen. Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wurden diesbezüglich Valproat, Butyrat und Trichostatin A untersucht. Die vorgestellten Ergebnisse zeigen, dass diese HDAC-Inhibitoren als wirkungsvolle Hemmstoffe tumorinduzierter Angiogenese gelten können.

Anhand verschiedener *in vitro* Angiogenesemodelle ließ sich zeigen, dass Valproat, Butyrat und Trichostatin A in der Lage sind, angiogeneserelevante Endothelzellfunktionen zu hemmen. So wurden die Proliferation, die Migration und die Ausbildung kapillarähnlicher tubulärer Strukturen von *human umbilical vein endothelial cells* (HUVECs) durch die Testsubstanzen zum Teil signifikant reduziert.

An der Induktion der Angiogenese sind Wachstumsfaktoren wie der *fibroblast growth factor* (FGF-2) und der *vascular endothelial growth factor* (VEGF) maßgeblich beteiligt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde unter anderem untersucht, ob Valproat, Butyrat und Trichostatin A ihre antiangiogene Wirkung möglicherweise über eine Beeinflussung dieser bedeutenden proangiogenen Faktoren entfalten. Die vorgestellten Ergebnisse zur Sekretions- und Expressionshemmung von FGF-2 und VEGF auf Protein- bzw. mRNA-Ebene bestätigten diese Überlegung.

Ein vorgeschaltetes Signalmolekül in der Wachstumsfaktor-induzierten Angiogenese ist der *hypoxia inducible factor-1 $\alpha$*  (HIF-1 $\alpha$ ). Es konnte nachgewiesen werden, dass Valproat, Butyrat und Trichostatin A die Expression dieses Transkriptionsfaktors im Gesamthomogenat von Caco-2 Zellen induzieren. Die Aktivität von HIF-1 $\alpha$  in der nukleären Caco-2 Fraktion wurde dagegen reduziert. Diese Resultate lassen sich möglicherweise auf eine Hemmung der nukleären Translokation von HIF-1 $\alpha$  zurückführen. Desweiteren ließ sich zeigen, dass die proteasomale Aktivität im Caco-2 Zelllysate durch Valproat, Butyrat und Trichostatin A zum Teil signifikant vermindert wurde. Dementsprechend liegt der deutlichen zytoplasmatischen Akkumulation des HIF-1 $\alpha$  Proteins wahrscheinlich auch eine Hemmung der proteasomalen Degradierung durch die Behandlungssubstanzen zugrunde.

Als Konsequenz dieser Ergebnisse wurde die Hypothese aufgestellt, dass die antiangiogene Wirkung der Testsubstanzen über eine Unterbrechung des HIF-1 $\alpha$  Signals vermittelt wird.

Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass HDAC-Inhibitoren über eine Beeinflussung der PI3K/AKT Signaltransduktionskaskade möglicherweise auch die Synthese von HIF-1 $\alpha$  stören. Dies konnte zumindest für Butyrat und Trichostatin A belegt werden. Für Valproat sind diesbezüglich weiterführende Untersuchungen nötig.

## 6 SUMMARY

Angiogenesis is of essential importance for the growth and metastasis of solid tumors. Its inhibition may be a valuable approach in cancer therapy, representing an important aspect of future treatment. Recent studies indicate that inhibitors of histone deacetylases are potent antiangiogenic agents. The subject of this work was to evaluate the antiangiogenic effects of the HDAC-inhibitors valproate, butyrate and trichostatin A. Our results indicate that the tested substances supposed to be effective inhibitors of tumor-derived angiogenesis.

Valproate, butyrate and trichostatin A appeared to be able to inhibit endothelial cell functions relevant for angiogenesis in different *in vitro* angiogenesis assays. Proliferation, migration as well as *tube formation* of HUVECs were suppressed by all tested drugs, at least partly in a significant manner.

Angiogenesis is induced by angiogenic growth factors such as *fibroblast growth factor* (FGF-2) and *vascular endothelial growth factor* (VEGF). One aim of this study was to find evidence for the thesis that valproate, butyrate and trichostatin A exert their antiangiogenic effects through a modulation of these important angiogenic factors. This consideration could be confirmed by decreased protein and mRNA levels of FGF-2 and VEGF.

*Hypoxia inducible factor-1 $\alpha$*  (HIF-1 $\alpha$ ) is a proceeding signal molecule of growth factor-induced angiogenesis. Valproate, butyrate and trichostatin A proved to induce the expression of this transcriptional factor in the whole cell lysat of Caco-2 cells.

However, the HIF-1 $\alpha$  DNA-binding activity in the nuclear extract of Caco-2 cells was reduced, which can possibly be explained by an inhibition of nuclear translocation of HIF-1 $\alpha$ . Further results could show that valproate, butyrate and trichostatin A led to a partly significant suppression of proteasome activity in the Caco-2 cell lysat. Thus, the marked cytoplasmatic accumulation of HIF-1 $\alpha$  protein, as observed in our experiments, is probably due to the inhibitory effects of valproate, butyrate and trichostatin A on the ubiquitin-proteasome pathway.

Summarizing our findings we concluded that the antiangiogenic effects of the tested substances are caused by a disruption of HIF-1 $\alpha$  signaling. Furthermore we assumed HDAC-inhibitors to be able to influence the HIF-1 $\alpha$  synthesis by modulating the PI3K/AKT pathway. This could be verified at least for butyrate and trichostatin A. Concerning valproate further examinations are needed.

## 7 LITERATURVERZEICHNIS

1. Boyle,P. and Langman,J.S. (2000) ABC of colorectal cancer: Epidemiology. *BMJ*, 321, 805-808.
2. Dancourt,V. and Faivre,J. (2004) [Epidemiology and screening of colorectal cancer]. *Rev.Prat.*, 54, 135-142.
3. Krebs in Deutschland. 4. überarbeitete, aktualisierte Ausgabe. 2004. Arbeitsgemeinschaft Bevölkerungsbezogener Krebsregister in Deutschland. Saarbrücken.
4. Kolonkarzinom, Rektumkarzinom, Analkarzinom. 2., überarbeitete Auflage. 2003. Interdisziplinäres Tumorzentrum Tübingen, Universitätsklinikum Tübingen.
5. Hardy,R.G., Meltzer,S.J., and Jankowski,J.A. (2000) ABC of colorectal cancer. Molecular basis for risk factors. *BMJ*, 321, 886-889.
6. Schmiegel,W.H., Bechstein,W.O., Kolorektales Karzinom. In: Caspary,W.F., Mössner,J., Stein,J.H. (Hrsg.) Therapie gastroenterologischer Krankheiten. Springer Medizin Verlag (2005), 326-341.
7. Scheppach,W., Boxberger,F., Luhrs,H., Melcher,R., and Menzel,T. (2000) [Effect of nutrition factors on the pathogenesis of colorectal carcinoma]. *Zentralbl.Chir*, 125 Suppl 1, 5-7.
8. Giovannucci,E. (2002) Modifiable risk factors for colon cancer. *Gastroenterol.Clin.North Am.*, 31, 925-943.
9. Giovannucci,E. (2003) Diet, body weight, and colorectal cancer: a summary of the epidemiologic evidence. *J.Womens Health (Larchmt.)*, 12, 173-182.
10. Fearon,E.R. and Vogelstein,B. (1990) A genetic model for colorectal tumorigenesis. *Cell*, 61, 759-767.
11. Vogelstein,B., Fearon,E.R., Hamilton,S.R., Kern,S.E., Preisinger,A.C., Leppert,M., Nakamura,Y., White,R., Smits,A.M., and Bos,J.L. (1988) Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N.Engl.J.Med.*, 319, 525-532.
12. Janne,P.A. and Mayer,R.J. (2000) Chemoprevention of colorectal cancer. *N.Engl.J.Med.*, 342, 1960-1968.
13. Kinzler KW,V.B. (1998) The genetic basis of human cancer.Colorectal tumors. New York: McGraw-Hill.
14. Fearon,E.R. (1992) Genetic alterations underlying colorectal tumorigenesis. *Cancer Surv.*, 12, 119-136.
15. Tsiotou,A.G., Krespis,E.N., Sakorafas,G.H., and Krespi,A.E. (1995) The genetic basis of colorectal cancer--clinical implications. *Eur.J.Surg.Oncol.*, 21, 96-100.

16. Vogelstein,B. and Kinzler,K.W. (2004) Cancer genes and the pathways they control. *Nat.Med.*, 10, 789-799.
17. Yamada,S., Yashiro,M., Maeda,K., Nishiguchi,Y., and Hirakawa,K. (2005) A novel high-specificity approach for colorectal neoplasia: Detection of K-ras2 oncogene mutation in normal mucosa. *Int.J.Cancer*, 113, 1015-1021.
18. Goerttler,K. (1989) [Europe against cancer. Thoughts on prevention]. *Dtsch.Med.Wochenschr.*, 114, 1336-1342.
19. Scheppach,W., Melcher,R., Luhrs,H., and Menzel,T. (2000) [Primary prevention of sporadic colorectal carcinoma by diet modification and drugs?]. *Internist (Berl)*, 41, 868-875.
20. Scheppach,W., Bingham,S., Boutron-Ruault,M.C., Gerhardsson,d., V, Moreno,V., Nagengast,F.M., Reifen,R., Riboli,E., Seitz,H.K., and Wahrendorf,J. (1999) WHO consensus statement on the role of nutrition in colorectal cancer. *Eur.J.Cancer Prev.*, 8, 57-62.
21. Herendeen,J.M. and Lindley,C. (2003) Use of NSAIDs for the chemoprevention of colorectal cancer. *Ann.Pharmacother.*, 37, 1664-1674.
22. Meyskens,F.L., Jr. and Gerner,E.W. (1999) Development of difluoromethylornithine (DFMO) as a chemoprevention agent. *Clin.Cancer Res.*, 5, 945-951.
23. Tomeo,C.A., Colditz,G.A., Willett,W.C., Giovannucci,E., Platz,E., Rockhill,B., Dart,H., and Hunter,D.J. (1999) Harvard Report on Cancer Prevention. Volume 3: prevention of colon cancer in the United States. *Cancer Causes Control*, 10, 167-180.
24. Duffield-Lillico,A.J., Shureiqi,I., and Lippman,S.M. (2004) Can selenium prevent colorectal cancer? A signpost from epidemiology. *J.Natl.Cancer Inst.*, 96, 1645-1647.
25. Baron,J.A., Beach,M., Mandel,J.S., van Stolk,R.U., Haile,R.W., Sandler,R.S., Rothstein,R., Summers,R.W., Snover,D.C., Beck,G.J., Bond,J.H., and Greenberg,E.R. (1999) Calcium supplements for the prevention of colorectal adenomas. Calcium Polyp Prevention Study Group. *N.Engl.J.Med.*, 340, 101-107.
26. Schmiegel,W., Adler,G., Fruhmorgen,P., Folsch,U., Graeven,U., Layer,P., Petrasch,S., Porschen,R., Pox,C., Sauerbruch,T., Schmoll,H.J., and Zeitz,M. (2000) [Colorectal carcinoma: prevention and early detection in an asymptomatic population--prevention in patients at risk--endoscopic diagnosis, therapy and after-care of polyps and carcinomas. German Society of Digestive and Metabolic Diseases/Study Group for Gastrointestinal Oncology]. *Z.Gastroenterol.*, 38, 49-75.
27. Lehnert,T., Methner,M., Pollok,A., Schaible,A., Hinz,U., and Herfarth,C. (2002) Multivisceral resection for locally advanced primary colon and rectal cancer: an analysis of prognostic factors in 201 patients. *Ann.Surg.*, 235, 217-225.
28. Medinger,M., Steinbild,S., and Mross,K. (2004) [Adjuvant and palliative anticancer treatment of colon carcinoma in 2004]. *Schweiz.Rundsch.Med.Prax.*, 93, 1633-1644.
29. Folkman,J. and Klagsbrun,M. (1987) Angiogenic factors. *Science*, 235, 442-447.

30. Folkman, J. (1990) What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? *J. Natl. Cancer Inst.*, 82, 4-6.
31. Hanahan, D. and Folkman, J. (1996) Patterns and emerging mechanisms of the angiogenic switch during tumorigenesis. *Cell*, 86, 353-364.
32. Beck, L., Jr. and D'Amore, P.A. (1997) Vascular development: cellular and molecular regulation. *FASEB J.*, 11, 365-373.
33. Risau, W. (1998) Development and differentiation of endothelium. *Kidney Int. Suppl.*, 67, S3-S6.
34. Rafii, S., Meeus, S., Dias, S., Hattori, K., Heissig, B., Shmelkov, S., Rafii, D., and Lyden, D. (2002) Contribution of marrow-derived progenitors to vascular and cardiac regeneration. *Semin. Cell Dev. Biol.*, 13, 61-67.
35. Folkman, J. and Shing, Y. (1992) Angiogenesis. *J. Biol. Chem.*, 267, 10931-10934.
36. Gargett, C.E. and Rogers, P.A. (2001) Human endometrial angiogenesis. *Reproduction.*, 121, 181-186.
37. Folkman, J. (1995) Angiogenesis in cancer, vascular, rheumatoid and other disease. *Nat. Med.*, 1, 27-31.
38. 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.
39. Ferrara, N. and Alitalo, K. (1999) Clinical applications of angiogenic growth factors and their inhibitors. *Nat. Med.*, 5, 1359-1364.
40. Koch, A.E. (1998) Review: angiogenesis: implications for rheumatoid arthritis. *Arthritis Rheum.*, 41, 951-962.
41. Folkman, J. (1972) Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. *Ann. Surg.*, 175, 409-416.
42. Boehm, T., Folkman, J., Browder, T., and O'Reilly, M.S. (1997) Antiangiogenic therapy of experimental cancer does not induce acquired drug resistance. *Nature*, 390, 404-407.
43. O'Reilly, M.S., Boehm, T., Shing, Y., Fukai, N., Vasios, G., Lane, W.S., Flynn, E., Birkhead, J.R., Olsen, B.R., and Folkman, J. (1997) Endostatin: an endogenous inhibitor of angiogenesis and tumor growth. *Cell*, 88, 277-285.
44. Dhanabal, M., Jeffers, M., and Larochelle, W.J. (2005) Anti-angiogenic therapy as a cancer treatment paradigm. *Curr. Med. Chem. Anti.-Canc. Agents*, 5, 115-130.
45. Folkman, J. (2002) Role of angiogenesis in tumor growth and metastasis. *Semin. Oncol.*, 29, 15-18.
46. Folkman, J. and Cotran, R. (1976) Relation of vascular proliferation to tumor growth. *Int. Rev. Exp. Pathol.*, 16, 207-248.

47. Shweiki,D., Itin,A., Soffer,D., and Keshet,E. (1992) Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature*, 359, 843-845.
48. Laughner,E., Taghavi,P., Chiles,K., Mahon,P.C., and Semenza,G.L. (2001) HER2 (neu) signaling increases the rate of hypoxia-inducible factor 1alpha (HIF-1alpha) synthesis: novel mechanism for HIF-1-mediated vascular endothelial growth factor expression. *Mol.Cell Biol.*, 21, 3995-4004.
49. Ravi,R., Mookerjee,B., Bhujwalla,Z.M., Sutter,C.H., Artemov,D., Zeng,Q., Dillehay,L.E., Madan,A., Semenza,G.L., and Bedi,A. (2000) Regulation of tumor angiogenesis by p53-induced degradation of hypoxia-inducible factor 1alpha. *Genes Dev.*, 14, 34-44.
50. Semenza,G.L. (2000) HIF-1: using two hands to flip the angiogenic switch. *Cancer Metastasis Rev.*, 19, 59-65.
51. Folkman,J. (1971) Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N.Engl.J.Med.*, 285, 1182-1186.
52. Angiogenesis Foundation. Understanding Angiogenesis (2004)  
[http://www.angio.org/understanding content/understanding.html](http://www.angio.org/understanding_content/understanding.html)
53. Daniel,T.O., Liu,H., Morrow,J.D., Crews,B.C., and Marnett,L.J. (1999) Thromboxane A2 is a mediator of cyclooxygenase-2-dependent endothelial migration and angiogenesis. *Cancer Res.*, 59, 4574-4577.
54. Dentelli,P., Del Sorbo,L., Rosso,A., Molinar,A., Garbarino,G., Camussi,G., Pegoraro,L., and Brizzi,M.F. (1999) Human IL-3 stimulates endothelial cell motility and promotes in vivo new vessel formation. *J.Immunol.*, 163, 2151-2159.
55. Maisonpierre,P.C., Suri,C., Jones,P.F., Bartunkova,S., Wiegand,S.J., Radziejewski,C., Compton,D., McClain,J., Aldrich,T.H., Papadopoulos,N., Daly,T.J., Davis,S., Sato,T.N., and Yancopoulos,G.D. (1997) Angiopoietin-2, a natural antagonist for Tie2 that disrupts in vivo angiogenesis. *Science*, 277, 55-60.
56. Moses,M.A., Wiederschain,D., Wu,I., Fernandez,C.A., Ghazizadeh,V., Lane,W.S., Flynn,E., Sytkowski,A., Tao,T., and Langer,R. (1999) Troponin I is present in human cartilage and inhibits angiogenesis. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 96, 2645-2650.
57. Sato,Y., Okamura,K., Morimoto,A., Hamanaka,R., Hamaguchi,K., Shimada,T., Ono,M., Kohno,K., Sakata,T., and Kuwano,M. (1993) Indispensable role of tissue-type plasminogen activator in growth factor-dependent tube formation of human microvascular endothelial cells in vitro. *Exp.Cell Res.*, 204, 223-229.
58. Volpert,O.V., Fong,T., Koch,A.E., Peterson,J.D., Waltenbaugh,C., Tepper,R.I., and Bouck,N.P. (1998) Inhibition of angiogenesis by interleukin 4. *J.Exp.Med.*, 188, 1039-1046.
59. Zhai,Y., Ni,J., Jiang,G.W., Lu,J., Xing,L., Lincoln,C., Carter,K.C., Janat,F., Kozak,D., Xu,S., Rojas,L., Aggarwal,B.B., Ruben,S., Li,L.Y., Gentz,R., and Yu,G.L. (1999) VEGI, a novel cytokine of the tumor necrosis factor family, is an angiogenesis

- inhibitor that suppresses the growth of colon carcinomas in vivo. *FASEB J.*, 13, 181-189.
60. [http://www.medscape.com/viewprogram/2629\\_pnt](http://www.medscape.com/viewprogram/2629_pnt) (2005)
61. Gasparini,G., Weidner,N., Bevilacqua,P., Maluta,S., Dalla,P.P., Caffo,O., Barbareschi,M., Boracchi,P., Marubini,E., and Pozza,F. (1994) Tumor microvessel density, p53 expression, tumor size, and peritumoral lymphatic vessel invasion are relevant prognostic markers in node-negative breast carcinoma. *J.Clin.Oncol.*, 12, 454-466.
62. Eatock,M.M., Schatzlein,A., and Kaye,S.B. (2000) Tumour vasculature as a target for anticancer therapy. *Cancer Treat.Rev.*, 26, 191-204.
63. Ferrara,N. (1999) Molecular and biological properties of vascular endothelial growth factor. *J.Mol.Med.*, 77, 527-543.
64. Murota,S.I., Onodera,M., and Morita,I. (2000) Regulation of angiogenesis by controlling VEGF receptor. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 902, 208-212.
65. <http://www.cancer.gov/cancertopics/understandingcancer/angiogenesis> (2005)
66. Davis,S. and Yancopoulos,G.D. (1999) The angiopoietins: Yin and Yang in angiogenesis. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.*, 237, 173-185.
67. Hobson,B. and Denekamp,J. (1984) Endothelial proliferation in tumours and normal tissues: continuous labelling studies. *Br.J.Cancer*, 49, 405-413.
68. Hammersen,F., Endrich,B., and Messmer,K. (1985) The fine structure of tumor blood vessels. I. Participation of non-endothelial cells in tumor angiogenesis. *Int.J.Microcirc.Clin.Exp.*, 4, 31-43.
69. Weidner,N., Semple,J.P., Welch,W.R., and Folkman,J. (1991) Tumor angiogenesis and metastasis--correlation in invasive breast carcinoma. *N.Engl.J.Med.*, 324, 1-8.
70. Ingber,D.E. and Folkman,J. (1989) How does extracellular matrix control capillary morphogenesis? *Cell*, 58, 803-805.
71. Ornitz,D.M. and Itoh,N. (2001) Fibroblast growth factors. *Genome Biol.*, 2, REVIEWS3005.
72. Gospodarowicz,D., Neufeld,G., and Schweigerer,L. (1987) Fibroblast growth factor: structural and biological properties. *J.Cell Physiol Suppl*, Suppl 5, 15-26.
73. Gospodarowicz,D., Neufeld,G., and Schweigerer,L. (1986) Molecular and biological characterization of fibroblast growth factor, an angiogenic factor which also controls the proliferation and differentiation of mesoderm and neuroectoderm derived cells. *Cell Differ.*, 19, 1-17.
74. Abraham,J.A., Mergia,A., Whang,J.L., Tumolo,A., Friedman,J., Hjerrild,K.A., Gospodarowicz,D., and Fiddes,J.C. (1986) Nucleotide sequence of a bovine clone encoding the angiogenic protein, basic fibroblast growth factor. *Science*, 233, 545-548.

75. Florkiewicz,R.Z. and Sommer,A. (1989) Human basic fibroblast growth factor gene encodes four polypeptides: three initiate translation from non-AUG codons. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 86, 3978-3981.
76. Moscatelli,D., Joseph-Silverstein,J., Manejias,R., and Rifkin,D.B. (1987) Mr 25,000 heparin-binding protein from guinea pig brain is a high molecular weight form of basic fibroblast growth factor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 84, 5778-5782.
77. Prats,H., Kaghad,M., Prats,A.C., Klagsbrun,M., Lelias,J.M., Liauzun,P., Chalon,P., Tauber,J.P., Amalric,F., and Smith,J.A. (1989) High molecular mass forms of basic fibroblast growth factor are initiated by alternative CUG codons. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 86, 1836-1840.
78. Gospodarowicz,D., Neufeld,G., and Schweigerer,L. (1986) Fibroblast growth factor. *Mol.Cell Endocrinol.*, 46, 187-204.
79. Abraham,J.A., Whang,J.L., Tumolo,A., Mergia,A., Friedman,J., Gospodarowicz,D., and Fiddes,J.C. (1986) Human basic fibroblast growth factor: nucleotide sequence and genomic organization. *EMBO J.*, 5, 2523-2528.
80. Mignatti,P., Morimoto,T., and Rifkin,D.B. (1992) Basic fibroblast growth factor, a protein devoid of secretory signal sequence, is released by cells via a pathway independent of the endoplasmic reticulum-Golgi complex. *J.Cell Physiol*, 151, 81-93.
81. Florkiewicz,R.Z., Majack,R.A., Buechler,R.D., and Florkiewicz,E. (1995) Quantitative export of FGF-2 occurs through an alternative, energy-dependent, non-ER/Golgi pathway. *J.Cell Physiol*, 162, 388-399.
82. Ornitz,D.M. (2000) FGFs, heparan sulfate and FGFRs: complex interactions essential for development. *Bioessays*, 22, 108-112.
83. Rusnati,M. and Presta,M. (1996) Interaction of angiogenic basic fibroblast growth factor with endothelial cell heparan sulfate proteoglycans. Biological implications in neovascularization. *Int.J.Clin.Lab Res.*, 26, 15-23.
84. Vlodaysky,I., Bar-Shavit,R., Ishai-Michaeli,R., Bashkin,P., and Fuks,Z. (1991) Extracellular sequestration and release of fibroblast growth factor: a regulatory mechanism? *Trends Biochem.Sci.*, 16, 268-271.
85. Aigner,A., Butscheid,M., Kunkel,P., Krause,E., Lamszus,K., Wellstein,A., and Czubyko,F. (2001) An FGF-binding protein (FGF-BP) exerts its biological function by parallel paracrine stimulation of tumor cell and endothelial cell proliferation through FGF-2 release. *Int.J.Cancer*, 92, 510-517.
86. Cross,M.J. and Claesson-Welsh,L. (2001) FGF and VEGF function in angiogenesis: signalling pathways, biological responses and therapeutic inhibition. *Trends Pharmacol.Sci.*, 22, 201-207.
87. D'Amore,P.A. (1990) Heparin-endothelial cell interactions. *Haemostasis*, 20 Suppl 1, 159-165.
88. Vlodaysky,I., Korner,G., Ishai-Michaeli,R., Bashkin,P., Bar-Shavit,R., and Fuks,Z. (1990) Extracellular matrix-resident growth factors and enzymes: possible

- involvement in tumor metastasis and angiogenesis. *Cancer Metastasis Rev.*, 9, 203-226.
89. McNeil,P.L., Muthukrishnan,L., Warder,E., and D'Amore,P.A. (1989) Growth factors are released by mechanically wounded endothelial cells. *J.Cell Biol.*, 109, 811-822.
90. Haimovitz-Friedman,A., Vlodaysky,I., Chaudhuri,A., Witte,L., and Fuks,Z. (1991) Autocrine effects of fibroblast growth factor in repair of radiation damage in endothelial cells. *Cancer Res.*, 51, 2552-2558.
91. Folkman,J., Klagsbrun,M., Sasse,J., Wadzinski,M., Ingber,D., and Vlodaysky,I. (1988) A heparin-binding angiogenic protein--basic fibroblast growth factor--is stored within basement membrane. *Am.J.Pathol.*, 130, 393-400.
92. Presta,M., Rusnati,M., Dell'Era,P., Tanghetti,E., Urbinati,C., Giuliani,R., and Leali,D. (2000) Examining new models for the study of autocrine and paracrine mechanisms of angiogenesis through FGF2-transfected endothelial and tumour cells. *Adv.Exp.Med.Biol.*, 476, 7-34.
93. Johnson,D.E. and Williams,L.T. (1993) Structural and functional diversity in the FGF receptor multigene family. *Adv.Cancer Res.*, 60, 1-41.
94. Javerzat,S., Auguste,P., and Bikfalvi,A. (2002) The role of fibroblast growth factors in vascular development. *Trends Mol.Med.*, 8, 483-489.
95. Plotnikov,A.N., Schlessinger,J., Hubbard,S.R., and Mohammadi,M. (1999) Structural basis for FGF receptor dimerization and activation. *Cell*, 98, 641-650.
96. Hughes,S.E. (1997) Differential expression of the fibroblast growth factor receptor (FGFR) multigene family in normal human adult tissues. *J.Histochem.Cytochem.*, 45, 1005-1019.
97. Goldfarb,M. (2001) Signaling by fibroblast growth factors: the inside story. *Sci.STKE.*, 2001, E37.
98. Ornitz,D.M., Xu,J., Colvin,J.S., McEwen,D.G., MacArthur,C.A., Coulier,F., Gao,G., and Goldfarb,M. (1996) Receptor specificity of the fibroblast growth factor family. *J.Biol.Chem.*, 271, 15292-15297.
99. <http://www.klagsbrunlab.org/> (2002)
100. Gospodarowicz,D. (1984) Biological activity in vivo and in vitro of pituitary and brain fibroblast growth factor. *Symp.Fundam.Cancer Res.*, 37, 109-134.
101. Gospodarowicz,D., Cheng,J., Lui,G.M., Baird,A., Esch,F., and Bohlen,P. (1985) Corpus luteum angiogenic factor is related to fibroblast growth factor. *Endocrinology*, 117, 2383-2391.
102. Reed,J.A., Albino,A.P., and McNutt,N.S. (1995) Human cutaneous mast cells express basic fibroblast growth factor. *Lab Invest*, 72, 215-222.

103. Gospodarowicz,D., Ferrara,N., Schweigerer,L., and Neufeld,G. (1987) Structural characterization and biological functions of fibroblast growth factor. *Endocr.Rev.*, 8, 95-114.
104. Gospodarowicz,D., Greenburg,G., Bialecki,H., and Zetter,B.R. (1978) Factors involved in the modulation of cell proliferation in vivo and in vitro: the role of fibroblast and epidermal growth factors in the proliferative response of mammalian cells. *In Vitro*, 14, 85-118.
105. Bikfalvi,A., Klein,S., Pintucci,G., and Rifkin,D.B. (1997) Biological roles of fibroblast growth factor-2. *Endocr.Rev.*, 18, 26-45.
106. Cuevas,P., Garcia-Calvo,M., Carceller,F., Reimers,D., Zazo,M., Cuevas,B., Munoz-Willery,I., Martinez-Coso,V., Lamas,S., and Gimenez-Gallego,G. (1996) Correction of hypertension by normalization of endothelial levels of fibroblast growth factor and nitric oxide synthase in spontaneously hypertensive rats. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 93, 11996-12001.
107. Allouche,M. and Bikfalvi,A. (1995) The role of fibroblast growth factor-2 (FGF-2) in hematopoiesis. *Prog.Growth Factor Res.*, 6, 35-48.
108. Kenyon,B.M., Voest,E.E., Chen,C.C., Flynn,E., Folkman,J., and D'Amato,R.J. (1996) A model of angiogenesis in the mouse cornea. *Invest Ophthalmol.Vis.Sci.*, 37, 1625-1632.
109. Ribatti,D., Vacca,A., Roncali,L., and Dammacco,F. (1996) The chick embryo chorioallantoic membrane as a model for in vivo research on angiogenesis. *Int.J.Dev.Biol.*, 40, 1189-1197.
110. Schweigerer,L., Neufeld,G., Friedman,J., Abraham,J.A., Fiddes,J.C., and Gospodarowicz,D. (1987) Capillary endothelial cells express basic fibroblast growth factor, a mitogen that promotes their own growth. *Nature*, 325, 257-259.
111. Vlodavsky,I., Folkman,J., Sullivan,R., Fridman,R., Ishai-Michaeli,R., Sasse,J., and Klagsbrun,M. (1987) Endothelial cell-derived basic fibroblast growth factor: synthesis and deposition into subendothelial extracellular matrix. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 84, 2292-2296.
112. Moscatelli,D., Presta,M., and Rifkin,D.B. (1986) Purification of a factor from human placenta that stimulates capillary endothelial cell protease production, DNA synthesis, and migration. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 83, 2091-2095.
113. Goto,F., Goto,K., Weindel,K., and Folkman,J. (1993) Synergistic effects of vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor on the proliferation and cord formation of bovine capillary endothelial cells within collagen gels. *Lab Invest*, 69, 508-517.
114. Meyer,M., Clauss,M., Lepple-Wienhues,A., Waltenberger,J., Augustin,H.G., Ziche,M., Lanz,C., Buttner,M., Rziha,H.J., and Dehio,C. (1999) A novel vascular endothelial growth factor encoded by Orf virus, VEGF-E, mediates angiogenesis via signalling through VEGFR-2 (KDR) but not VEGFR-1 (Flt-1) receptor tyrosine kinases. *EMBO J.*, 18, 363-374.

115. Veikkola,T. and Alitalo,K. (1999) VEGFs, receptors and angiogenesis. *Semin.Cancer Biol.*, 9, 211-220.
116. Wise,L.M., Veikkola,T., Mercer,A.A., Savory,L.J., Fleming,S.B., Caesar,C., Vitali,A., Makinen,T., Alitalo,K., and Stacker,S.A. (1999) Vascular endothelial growth factor (VEGF)-like protein from orf virus NZ2 binds to VEGFR2 and neuropilin-1. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 96, 3071-3076.
117. Carmeliet,P. (2000) Mechanisms of angiogenesis and arteriogenesis. *Nat.Med.*, 6, 389-395.
118. Jeltsch,M., Kaipainen,A., Joukov,V., Meng,X., Lakso,M., Rauvala,H., Swartz,M., Fukumura,D., Jain,R.K., and Alitalo,K. (1997) Hyperplasia of lymphatic vessels in VEGF-C transgenic mice. *Science*, 276, 1423-1425.
119. Bellomo,D., Headrick,J.P., Silins,G.U., Paterson,C.A., Thomas,P.S., Gartside,M., Mould,A., Cahill,M.M., Tonks,I.D., Grimmond,S.M., Townson,S., Wells,C., Little,M., Cummings,M.C., Hayward,N.K., and Kay,G.F. (2000) Mice lacking the vascular endothelial growth factor-B gene (*Vegfb*) have smaller hearts, dysfunctional coronary vasculature, and impaired recovery from cardiac ischemia. *Circ.Res.*, 86, E29-E35.
120. Eriksson,U. and Alitalo,K. (1999) Structure, expression and receptor-binding properties of novel vascular endothelial growth factors. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.*, 237, 41-57.
121. Lobb,R.R., Key,M.E., Alderman,E.M., and Fett,J.W. (1985) Partial purification and characterization of a vascular permeability factor secreted by a human colon adenocarcinoma cell line. *Int.J.Cancer*, 36, 473-478.
122. Ferrara,N. and Henzel,W.J. (1989) Pituitary follicular cells secrete a novel heparin-binding growth factor specific for vascular endothelial cells. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 161, 851-858.
123. Ferrara,N. (1999) Vascular endothelial growth factor: molecular and biological aspects. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.*, 237, 1-30.
124. Houck,K.A., Leung,D.W., Rowland,A.M., Winer,J., and Ferrara,N. (1992) Dual regulation of vascular endothelial growth factor bioavailability by genetic and proteolytic mechanisms. *J.Biol.Chem.*, 267, 26031-26037.
125. Park,J.E., Keller,G.A., and Ferrara,N. (1993) The vascular endothelial growth factor (VEGF) isoforms: differential deposition into the subepithelial extracellular matrix and bioactivity of extracellular matrix-bound VEGF. *Mol.Biol.Cell*, 4, 1317-1326.
126. "Übersichten". DMW 123. Jg (Nr. 9), 259-265. 1998.
127. Houck,K.A., Ferrara,N., Winer,J., Cachianes,G., Li,B., and Leung,D.W. (1991) The vascular endothelial growth factor family: identification of a fourth molecular species and characterization of alternative splicing of RNA. *Mol.Endocrinol.*, 5, 1806-1814.
128. Klagsbrun,M. and D'Amore,P.A. (1996) Vascular endothelial growth factor and its receptors. *Cytokine Growth Factor Rev.*, 7, 259-270.

129. Dvorak,H.F., Nagy,J.A., Feng,D., Brown,L.F., and Dvorak,A.M. (1999) Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and the significance of microvascular hyperpermeability in angiogenesis. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.*, 237, 97-132.
130. Shibuya,M., Ito,N., and Claesson-Welsh,L. (1999) Structure and function of vascular endothelial growth factor receptor-1 and -2. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.*, 237, 59-83.
131. Terman,B., Khandke,L., Dougher-Vermazan,M., Maglione,D., Lassam,N.J., Gospodarowicz,D., Persico,M.G., Bohlen,P., and Eisinger,M. (1994) VEGF receptor subtypes KDR and FLT1 show different sensitivities to heparin and placenta growth factor. *Growth Factors*, 11, 187-195.
132. Taipale,J., Makinen,T., Arighi,E., Kukk,E., Karkkainen,M., and Alitalo,K. (1999) Vascular endothelial growth factor receptor-3. *Curr.Top.Microbiol.Immunol.*, 237, 85-96.
133. Shalaby,F., Rossant,J., Yamaguchi,T.P., Gertsenstein,M., Wu,X.F., Breitman,M.L., and Schuh,A.C. (1995) Failure of blood-island formation and vasculogenesis in Flk-1-deficient mice. *Nature*, 376, 62-66.
134. Fournier,E., Birnbaum,D., and Borg,J.P. (1997) [Receptors for factors of the VEGF (Vascular Endothelial Growth Family)]. *Bull.Cancer*, 84, 397-405.
135. van der,G.P., Hunter,T., and Lindberg,R.A. (1994) Receptor protein-tyrosine kinases and their signal transduction pathways. *Annu.Rev.Cell Biol.*, 10, 251-337.
136. Soker,S., Takashima,S., Miao,H.Q., Neufeld,G., and Klagsbrun,M. (1998) Neuropilin-1 is expressed by endothelial and tumor cells as an isoform-specific receptor for vascular endothelial growth factor. *Cell*, 92, 735-745.
137. [http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/6460/vegf\\_rec\\_ligands.gif](http://www.sigmaaldrich.com/img/assets/6460/vegf_rec_ligands.gif) (2005)
138. Connolly,D.T., Heuvelman,D.M., Nelson,R., Olander,J.V., Eppley,B.L., Delfino,J.J., Siegel,N.R., Leimgruber,R.M., and Feder,J. (1989) Tumor vascular permeability factor stimulates endothelial cell growth and angiogenesis. *J.Clin.Invest*, 84, 1470-1478.
139. Leung,D.W., Cachianes,G., Kuang,W.J., Goeddel,D.V., and Ferrara,N. (1989) Vascular endothelial growth factor is a secreted angiogenic mitogen. *Science*, 246, 1306-1309.
140. Phillips,G.D., Stone,A.M., Jones,B.D., Schultz,J.C., Whitehead,R.A., and Knighton,D.R. (1994) Vascular endothelial growth factor (rhVEGF165) stimulates direct angiogenesis in the rabbit cornea. *In Vivo*, 8, 961-965.
141. Plouet,J., Schilling,J., and Gospodarowicz,D. (1989) Isolation and characterization of a newly identified endothelial cell mitogen produced by AtT-20 cells. *EMBO J.*, 8, 3801-3806.
142. Gerber,H.P., McMurtrey,A., Kowalski,J., Yan,M., Keyt,B.A., Dixit,V., and Ferrara,N. (1998) Vascular endothelial growth factor regulates endothelial cell survival through

- the phosphatidylinositol 3'-kinase/Akt signal transduction pathway. Requirement for Flk-1/KDR activation. *J.Biol.Chem.*, 273, 30336-30343.
143. Ilan,N., Mahooti,S., and Madri,J.A. (1998) Distinct signal transduction pathways are utilized during the tube formation and survival phases of in vitro angiogenesis. *J.Cell Sci.*, 111 ( Pt 24), 3621-3631.
  144. Tran,J., Rak,J., Sheehan,C., Saibil,S.D., LaCasse,E., Korneluk,R.G., and Kerbel,R.S. (1999) Marked induction of the IAP family antiapoptotic proteins survivin and XIAP by VEGF in vascular endothelial cells. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 264, 781-788.
  145. Alon,T., Hemo,I., Itin,A., Pe'er,J., Stone,J., and Keshet,E. (1995) Vascular endothelial growth factor acts as a survival factor for newly formed retinal vessels and has implications for retinopathy of prematurity. *Nat.Med.*, 1, 1024-1028.
  146. Rifkin,D.B., Moscatelli,D., Bizik,J., Quarto,N., Blei,F., Dennis,P., Flaumenhaft,R., and Mignatti,P. (1990) Growth factor control of extracellular proteolysis. *Cell Differ.Dev.*, 32, 313-318.
  147. Tolnay,E., Wiethege,T., Kuhnen,C., Wulf,M., Voss,B., and Muller,K.M. (1997) Expression of type IV collagenase correlates with the expression of vascular endothelial growth factor in primary non-small cell lung cancer. *J.Cancer Res.Clin.Oncol.*, 123, 652-658.
  148. Zucker,S., Mirza,H., Conner,C.E., Lorenz,A.F., Drews,M.H., Bahou,W.F., and Jesty,J. (1998) Vascular endothelial growth factor induces tissue factor and matrix metalloproteinase production in endothelial cells: conversion of prothrombin to thrombin results in progelatinase A activation and cell proliferation. *Int.J.Cancer*, 75, 780-786.
  149. Pepper,M.S., Ferrara,N., Orci,L., and Montesano,R. (1992) Potent synergism between vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor in the induction of angiogenesis in vitro. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 189, 824-831.
  150. Dvorak,H.F. (1986) Tumors: wounds that do not heal. Similarities between tumor stroma generation and wound healing. *N.Engl.J.Med.*, 315, 1650-1659.
  151. Dvorak,H.F., Harvey,V.S., Estrella,P., Brown,L.F., McDonagh,J., and Dvorak,A.M. (1987) Fibrin containing gels induce angiogenesis. Implications for tumor stroma generation and wound healing. *Lab Invest*, 57, 673-686.
  152. Dvorak,H.F., Brown,L.F., Detmar,M., and Dvorak,A.M. (1995) Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor, microvascular hyperpermeability, and angiogenesis. *Am.J.Pathol.*, 146, 1029-1039.
  153. Ku,D.D., Zaleski,J.K., Liu,S., and Brock,T.A. (1993) Vascular endothelial growth factor induces EDRF-dependent relaxation in coronary arteries. *Am.J.Physiol*, 265, H586-H592.
  154. Yang,R., Thomas,G.R., Bunting,S., Ko,A., Ferrara,N., Keyt,B., Ross,J., and Jin,H. (1996) Effects of vascular endothelial growth factor on hemodynamics and cardiac performance. *J.Cardiovasc.Pharmacol.*, 27, 838-844.

155. Carmeliet,P., Ferreira,V., Breier,G., Pollefeyt,S., Kieckens,L., Gertsenstein,M., Fahrig,M., Vandenhoek,A., Harpal,K., Eberhardt,C., Declercq,C., Pawling,J., Moons,L., Collen,D., Risau,W., and Nagy,A. (1996) Abnormal blood vessel development and lethality in embryos lacking a single VEGF allele. *Nature*, 380, 435-439.
156. Ferrara,N., Carver-Moore,K., Chen,H., Dowd,M., Lu,L., O'Shea,K.S., Powell Braxton,L., Hillan,K.J., and Moore,M.W. (1996) Heterozygous embryonic lethality induced by targeted inactivation of the VEGF gene. *Nature*, 380, 439-442.
157. Gerber,H.P., Hillan,K.J., Ryan,A.M., Kowalski,J., Keller,G.A., Rangell,L., Wright,B.D., Radtke,F., Aguet,M., and Ferrara,N. (1999) VEGF is required for growth and survival in neonatal mice. *Development*, 126, 1149-1159.
158. Yancopoulos,G.D., Davis,S., Gale,N.W., Rudge,J.S., Wiegand,S.J., and Holash,J. (2000) Vascular-specific growth factors and blood vessel formation. *Nature*, 407, 242-248.
159. Gerber,H.P., Vu,T.H., Ryan,A.M., Kowalski,J., Werb,Z., and Ferrara,N. (1999) VEGF couples hypertrophic cartilage remodeling, ossification and angiogenesis during endochondral bone formation. *Nat.Med.*, 5, 623-628.
160. Ferrara,N., Chen,H., Davis-Smyth,T., Gerber,H.P., Nguyen,T.N., Peers,D., Chisholm,V., Hillan,K.J., and Schwall,R.H. (1998) Vascular endothelial growth factor is essential for corpus luteum angiogenesis. *Nat.Med.*, 4, 336-340.
161. Nissen,N.N., Polverini,P.J., Koch,A.E., Volin,M.V., Gamelli,R.L., and DiPietro,L.A. (1998) Vascular endothelial growth factor mediates angiogenic activity during the proliferative phase of wound healing. *Am.J.Pathol.*, 152, 1445-1452.
162. Semenza,G.L. (2000) HIF-1: mediator of physiological and pathophysiological responses to hypoxia. *J.Appl.Physiol*, 88, 1474-1480.
163. Wang,G.L., Jiang,B.H., Rue,E.A., and Semenza,G.L. (1995) Hypoxia-inducible factor 1 is a basic-helix-loop-helix-PAS heterodimer regulated by cellular O<sub>2</sub> tension. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 92, 5510-5514.
164. Fukuda,R., Hirota,K., Fan,F., Jung,Y.D., Ellis,L.M., and Semenza,G.L. (2002) Insulin-like growth factor 1 induces hypoxia-inducible factor 1-mediated vascular endothelial growth factor expression, which is dependent on MAP kinase and phosphatidylinositol 3-kinase signaling in colon cancer cells. *J.Biol.Chem.*, 277, 38205-38211.
165. Zhong,H., Chiles,K., Feldser,D., Laughner,E., Hanrahan,C., Georgescu,M.M., Simons,J.W., and Semenza,G.L. (2000) Modulation of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  expression by the epidermal growth factor/phosphatidylinositol 3-kinase/PTEN/AKT/FRAP pathway in human prostate cancer cells: implications for tumor angiogenesis and therapeutics. *Cancer Res.*, 60, 1541-1545.
166. Ivan,M., Kondo,K., Yang,H., Kim,W., Valiando,J., Ohh,M., Salic,A., Asara,J.M., Lane,W.S., and Kaelin,W.G., Jr. (2001) HIF $\alpha$  targeted for VHL-mediated destruction by proline hydroxylation: implications for O<sub>2</sub> sensing. *Science*, 292, 464-468.

167. Jaakkola,P., Mole,D.R., Tian,Y.M., Wilson,M.I., Gielbert,J., Gaskell,S.J., Kriegsheim,A., Hebestreit,H.F., Mukherji,M., Schofield,C.J., Maxwell,P.H., Pugh,C.W., and Ratcliffe,P.J. (2001) Targeting of HIF- $\alpha$  to the von Hippel-Lindau ubiquitylation complex by O<sub>2</sub>-regulated prolyl hydroxylation. *Science*, 292, 468-472.
168. Masson,N., Willam,C., Maxwell,P.H., Pugh,C.W., and Ratcliffe,P.J. (2001) Independent function of two destruction domains in hypoxia-inducible factor- $\alpha$  chains activated by prolyl hydroxylation. *EMBO J.*, 20, 5197-5206.
169. Salceda,S. and Caro,J. (1997) Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  (HIF-1 $\alpha$ ) protein is rapidly degraded by the ubiquitin-proteasome system under normoxic conditions. Its stabilization by hypoxia depends on redox-induced changes. *J.Biol.Chem.*, 272, 22642-22647.
170. Semenza,G.L. (2002) HIF-1 and tumor progression: pathophysiology and therapeutics. *Trends Mol.Med.*, 8, S62-S67.
171. Kuwai,T., Kitadai,Y., Tanaka,S., Onogawa,S., Matsutani,N., Kaio,E., Ito,M., and Chayama,K. (2003) Expression of hypoxia-inducible factor-1 $\alpha$  is associated with tumor vascularization in human colorectal carcinoma. *Int.J.Cancer*, 105, 176-181.
172. Zhong,H., De Marzo,A.M., Laughner,E., Lim,M., Hilton,D.A., Zagzag,D., Buechler,P., Isaacs,W.B., Semenza,G.L., and Simons,J.W. (1999) Overexpression of hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$  in common human cancers and their metastases. *Cancer Res.*, 59, 5830-5835.
173. Maxwell,P.H., Pugh,C.W., and Ratcliffe,P.J. (2001) Activation of the HIF pathway in cancer. *Curr.Opin.Genet.Dev.*, 11, 293-299.
174. Chen,C., Pore,N., Behrooz,A., Ismail-Beigi,F., and Maity,A. (2001) Regulation of glut1 mRNA by hypoxia-inducible factor-1. Interaction between H-ras and hypoxia. *J.Biol.Chem.*, 276, 9519-9525.
175. Jiang,B.H., Agani,F., Passaniti,A., and Semenza,G.L. (1997) V-SRC induces expression of hypoxia-inducible factor 1 (HIF-1) and transcription of genes encoding vascular endothelial growth factor and enolase 1: involvement of HIF-1 in tumor progression. *Cancer Res.*, 57, 5328-5335.
176. Maxwell,P.H., Wiesener,M.S., Chang,G.W., Clifford,S.C., Vaux,E.C., Cockman,M.E., Wykoff,C.C., Pugh,C.W., Maher,E.R., and Ratcliffe,P.J. (1999) The tumour suppressor protein VHL targets hypoxia-inducible factors for oxygen-dependent proteolysis. *Nature*, 399, 271-275.
177. Zundel,W., Schindler,C., Haas-Kogan,D., Koong,A., Kaper,F., Chen,E., Gottschalk,A.R., Ryan,H.E., Johnson,R.S., Jefferson,A.B., Stokoe,D., and Giaccia,A.J. (2000) Loss of PTEN facilitates HIF-1-mediated gene expression. *Genes Dev.*, 14, 391-396.
178. O'Reilly,M.S., Holmgren,L., Shing,Y., Chen,C., Rosenthal,R.A., Moses,M., Lane,W.S., Cao,Y., Sage,E.H., and Folkman,J. (1994) Angiostatin: a novel angiogenesis inhibitor that mediates the suppression of metastases by a Lewis lung carcinoma. *Cell*, 79, 315-328.

179. Cao,Y. (1999) Therapeutic potentials of angiostatin in the treatment of cancer. *Haematologica*, 84, 643-650.
180. O'Reilly,M.S., Holmgren,L., Chen,C., and Folkman,J. (1996) Angiostatin induces and sustains dormancy of human primary tumors in mice. *Nat.Med.*, 2, 689-692.
181. Gately,S., Twardowski,P., Stack,M.S., Patrick,M., Boggio,L., Cundiff,D.L., Schnaper,H.W., Madison,L., Volpert,O., Bouck,N., Enghild,J., Kwaan,H.C., and Soff,G.A. (1996) Human prostate carcinoma cells express enzymatic activity that converts human plasminogen to the angiogenesis inhibitor, angiostatin. *Cancer Res.*, 56, 4887-4890.
182. Dinney,C.P., Bielenberg,D.R., Perrotte,P., Reich,R., Eve,B.Y., Bucana,C.D., and Fidler,I.J. (1998) Inhibition of basic fibroblast growth factor expression, angiogenesis, and growth of human bladder carcinoma in mice by systemic interferon-alpha administration. *Cancer Res.*, 58, 808-814.
183. Greinwald,J.H., Jr., Burke,D.K., Bonthius,D.J., Bauman,N.M., and Smith,R.J. (1999) An update on the treatment of hemangiomas in children with interferon alfa-2a. *Arch.Otolaryngol.Head Neck Surg.*, 125, 21-27.
184. Grossfeld,G.D., Ginsberg,D.A., Stein,J.P., Bochner,B.H., Esrig,D., Groshen,S., Dunn,M., Nichols,P.W., Taylor,C.R., Skinner,D.G., and Cote,R.J. (1997) Thrombospondin-1 expression in bladder cancer: association with p53 alterations, tumor angiogenesis, and tumor progression. *J.Natl.Cancer Inst.*, 89, 219-227.
185. Takano,S., Gately,S., Neville,M.E., Herblin,W.F., Gross,J.L., Engelhard,H., Perricone,M., Eidsvoog,K., and Brem,S. (1994) Suramin, an anticancer and angiosuppressive agent, inhibits endothelial cell binding of basic fibroblast growth factor, migration, proliferation, and induction of urokinase-type plasminogen activator. *Cancer Res.*, 54, 2654-2660.
186. Zugmaier,G., Lippman,M.E., and Wellstein,A. (1992) Inhibition by pentosan polysulfate (PPS) of heparin-binding growth factors released from tumor cells and blockage by PPS of tumor growth in animals. *J.Natl.Cancer Inst.*, 84, 1716-1724.
187. Miao,H.Q., Ornitz,D.M., Aingorn,E., Ben Sasson,S.A., and Vlodaysky,I. (1997) Modulation of fibroblast growth factor-2 receptor binding, dimerization, signaling, and angiogenic activity by a synthetic heparin-mimicking polyanionic compound. *J.Clin.Invest*, 99, 1565-1575.
188. Firsching,A., Nickel,P., Mora,P., and Allolio,B. (1995) Antiproliferative and angiostatic activity of suramin analogues. *Cancer Res.*, 55, 4957-4961.
189. Kim,K.J., Li,B., Winer,J., Armanini,M., Gillett,N., Phillips,H.S., and Ferrara,N. (1993) Inhibition of vascular endothelial growth factor-induced angiogenesis suppresses tumour growth in vivo. *Nature*, 362, 841-844.
190. Garber,K. (2002) Angiogenesis inhibitors suffer new setback. *Nat.Biotechnol.*, 20, 1067-1068.

191. Makino, Y., Cao, R., Svensson, K., Bertilsson, G., Asman, M., Tanaka, H., Cao, Y., Berkenstam, A., and Poellinger, L. (2001) Inhibitory PAS domain protein is a negative regulator of hypoxia-inducible gene expression. *Nature*, 414, 550-554.
192. Niethammer, A.G., Xiang, R., Becker, J.C., Wodrich, H., Pertl, U., Karsten, G., Eliceiri, B.P., and Reisfeld, R.A. (2002) A DNA vaccine against VEGF receptor 2 prevents effective angiogenesis and inhibits tumor growth. *Nat.Med.*, 8, 1369-1375.
193. Ferrara, N. (2002) VEGF and the quest for tumour angiogenesis factors. *Nat.Rev.Cancer*, 2, 795-803.
194. Shaheen, R.M., Davis, D.W., Liu, W., Zebrowski, B.K., Wilson, M.R., Bucana, C.D., McConkey, D.J., McMahon, G., and Ellis, L.M. (1999) Antiangiogenic therapy targeting the tyrosine kinase receptor for vascular endothelial growth factor receptor inhibits the growth of colon cancer liver metastasis and induces tumor and endothelial cell apoptosis. *Cancer Res.*, 59, 5412-5416.
195. Antoine, N., Greimers, R., De Roanne, C., Kusaka, M., Heinen, E., Simar, L.J., and Castronovo, V. (1994) AGM-1470, a potent angiogenesis inhibitor, prevents the entry of normal but not transformed endothelial cells into the G1 phase of the cell cycle. *Cancer Res.*, 54, 2073-2076.
196. Yoshida, A., Anand-Apte, B., and Zetter, B.R. (1996) Differential endothelial migration and proliferation to basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor. *Growth Factors*, 13, 57-64.
197. Turk, B.E., Griffith, E.C., Wolf, S., Biemann, K., Chang, Y.H., and Liu, J.O. (1999) Selective inhibition of amino-terminal methionine processing by TNP-470 and ovalicin in endothelial cells. *Chem.Biol.*, 6, 823-833.
198. Taunton, J. (1997) How to starve a tumor. *Chem.Biol.*, 4, 493-496.
199. Liekens, S., Verbeken, E., Vandeputte, M., De Clercq, E., and Neyts, J. (1999) A novel animal model for hemangiomas: inhibition of hemangioma development by the angiogenesis inhibitor TNP-470. *Cancer Res.*, 59, 2376-2383.
200. Sasaki, A., Alcalde, R.E., Nishiyama, A., Lim, D.D., Mese, H., Akedo, H., and Matsumura, T. (1998) Angiogenesis inhibitor TNP-470 inhibits human breast cancer osteolytic bone metastasis in nude mice through the reduction of bone resorption. *Cancer Res.*, 58, 462-467.
201. Tanaka, T., Konno, H., Matsuda, I., Nakamura, S., and Baba, S. (1995) Prevention of hepatic metastasis of human colon cancer by angiogenesis inhibitor TNP-470. *Cancer Res.*, 55, 836-839.
202. Yanase, T., Tamura, M., Fujita, K., Kodama, S., and Tanaka, K. (1993) Inhibitory effect of angiogenesis inhibitor TNP-470 on tumor growth and metastasis of human cell lines in vitro and in vivo. *Cancer Res.*, 53, 2566-2570.
203. Tran, H.T., Blumenschein, G.R., Jr., Lu, C., Meyers, C.A., Papadimitrakopoulou, V., Fossella, F.V., Zinner, R., Madden, T., Smythe, L.G., Puduvalli, V.K., Munden, R., Truong, M., and Herbst, R.S. (2004) Clinical and pharmacokinetic study of TNP-470,

- an angiogenesis inhibitor, in combination with paclitaxel and carboplatin in patients with solid tumors. *Cancer Chemother.Pharmacol.*
204. Chambers,A.F. and Matrisian,L.M. (1997) Changing views of the role of matrix metalloproteinases in metastasis. *J.Natl.Cancer Inst.*, 89, 1260-1270.
205. Wojtowicz-Praga,S.M., Dickson,R.B., and Hawkins,M.J. (1997) Matrix metalloproteinase inhibitors. *Invest New Drugs*, 15, 61-75.
206. Albini,A., Melchiori,A., Santi,L., Liotta,L.A., Brown,P.D., and Stetler-Stevenson,W.G. (1991) Tumor cell invasion inhibited by TIMP-2. *J.Natl.Cancer Inst.*, 83, 775-779.
207. Carmichael,D.F., Sommer,A., Thompson,R.C., Anderson,D.C., Smith,C.G., Welgus,H.G., and Stricklin,G.P. (1986) Primary structure and cDNA cloning of human fibroblast collagenase inhibitor. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 83, 2407-2411.
208. Rosemurgy,A., Harris,J., Langleben,A., Casper,E., Goode,S., and Rasmussen,H. (1999) Marimastat in patients with advanced pancreatic cancer: a dose-finding study. *Am.J.Clin.Oncol.*, 22, 247-252.
209. Jones,P.H., Christodoulos,K., Dobbs,N., Thavasu,P., Balkwill,F., Blann,A.D., Caine,G.J., Kumar,S., Kakkar,A.J., Gompertz,N., Talbot,D.C., Ganesan,T.S., and Harris,A.L. (2004) Combination antiangiogenesis therapy with marimastat, captopril and fragmin in patients with advanced cancer. *Br.J.Cancer*, 91, 30-36.
210. Ramnath,N. and Creaven,P.J. (2004) Matrix metalloproteinase inhibitors. *Curr.Oncol.Rep.*, 6, 96-102.
211. Wall,L., Talbot,D.C., Bradbury,P., and Jodrell,D.I. (2004) A phase I and pharmacological study of the matrix metalloproteinase inhibitor BB-3644 in patients with solid tumours. *Br.J.Cancer*, 90, 800-804.
212. Gilbertson-Beadling,S., Powers,E.A., Stamp-Cole,M., Scott,P.S., Wallace,T.L., Copeland,J., Petzold,G., Mitchell,M., Ledbetter,S., and Poorman,R. (1995) The tetracycline analogs minocycline and doxycycline inhibit angiogenesis in vitro by a non-metalloproteinase-dependent mechanism. *Cancer Chemother.Pharmacol.*, 36, 418-424.
213. Rudek,M.A., Figg,W.D., Dyer,V., Dahut,W., Turner,M.L., Steinberg,S.M., Liewehr,D.J., Kohler,D.R., Pluda,J.M., and Reed,E. (2001) Phase I clinical trial of oral COL-3, a matrix metalloproteinase inhibitor, in patients with refractory metastatic cancer. *J.Clin.Oncol.*, 19, 584-592.
214. Richards,B., Pardon,J., Lilley,D., Cotter,R., Wooley,J., and Worchester,D. (1977) The sub-structure of nucleosomes. *Cell Biol.Int.Rep.*, 1, 107-116.
215. Suda,M. and Iwai,K. (1979) Identification of suberimidate cross-linking sites of four histone sequences in H1-depleted chromatin. Histone arrangement in nucleosome core. *J.Biochem.(Tokyo)*, 86, 1659-1670.
216. Thomas,J.O. (1984) The higher order structure of chromatin and histone H1. *J.Cell Sci.Suppl*, 1, 1-20.

217. Allan,J., Harborne,N., Rau,D.C., and Gould,H. (1982) Participation of core histone "tails" in the stabilization of the chromatin solenoid. *J.Cell Biol.*, 93, 285-297.
218. Lee,D.Y., Hayes,J.J., Pruss,D., and Wolffe,A.P. (1993) A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell*, 72, 73-84.
219. Hansen,J.C., Tse,C., and Wolffe,A.P. (1998) Structure and function of the core histone N-termini: more than meets the eye. *Biochemistry*, 37, 17637-17641.
220. Wang,S., Yan-Neale,Y., Zeremski,M., and Cohen,D. (2004) Transcription regulation by histone deacetylases. *Novartis.Found.Symp.*, 259, 238-245.
221. Cheung,W.L., Briggs,S.D., and Allis,C.D. (2000) Acetylation and chromosomal functions. *Curr.Opin.Cell Biol.*, 12, 326-333.
222. Marks,P.A., Richon,V.M., Miller,T., and Kelly,W.K. (2004) Histone deacetylase inhibitors. *Adv.Cancer Res.*, 91, 137-168.
223. Jeppesen,P. and Turner,B.M. (1993) The inactive X chromosome in female mammals is distinguished by a lack of histone H4 acetylation, a cytogenetic marker for gene expression. *Cell*, 74, 281-289.
224. Hagmann,M. (1999) How chromatin changes its shape. *Science*, 285, 1200-1, 1203.
225. Knezetic,J.A. and Luse,D.S. (1986) The presence of nucleosomes on a DNA template prevents initiation by RNA polymerase II in vitro. *Cell*, 45, 95-104.
226. Griffith et al. (1996) *An Introduction to GENETIC ANALYSIS*.
227. ALLFREY,V.G., FAULKNER,R., and MIRSKY,A.E. (1964) ACETYLATION AND METHYLATION OF HISTONES AND THEIR POSSIBLE ROLE IN THE REGULATION OF RNA SYNTHESIS. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 51, 786-794.
228. Furukawa,Y., Kawakami,T., Sudo,K., Inazawa,J., Matsumine,A., Akiyama,T., and Nakamura,Y. (1996) Isolation and mapping of a human gene (RPD3L1) that is homologous to RPD3, a transcription factor in *Saccharomyces cerevisiae*. *Cytogenet.Cell Genet.*, 73, 130-133.
229. Taunton,J., Hassig,C.A., and Schreiber,S.L. (1996) A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p. *Science*, 272, 408-411.
230. Emiliani,S., Fischle,W., Van Lint,C., Al Abed,Y., and Verdin,E. (1998) Characterization of a human RPD3 ortholog, HDAC3. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 95, 2795-2800.
231. Grozinger,C.M., Hassig,C.A., and Schreiber,S.L. (1999) Three proteins define a class of human histone deacetylases related to yeast Hda1p. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 96, 4868-4873.
232. Hu,E., Chen,Z., Fredrickson,T., Zhu,Y., Kirkpatrick,R., Zhang,G.F., Johanson,K., Sung,C.M., Liu,R., and Winkler,J. (2000) Cloning and characterization of a novel human class I histone deacetylase that functions as a transcription repressor. *J.Biol.Chem.*, 275, 15254-15264.

233. Kao,H.Y., Downes,M., Ordentlich,P., and Evans,R.M. (2000) Isolation of a novel histone deacetylase reveals that class I and class II deacetylases promote SMRT-mediated repression. *Genes Dev.*, 14, 55-66.
234. Kao,H.Y., Lee,C.H., Komarov,A., Han,C.C., and Evans,R.M. (2002) Isolation and characterization of mammalian HDAC10, a novel histone deacetylase. *J.Biol.Chem.*, 277, 187-193.
235. Wang,A.H., Bertos,N.R., Vezmar,M., Pelletier,N., Crosato,M., Heng,H.H., Th'ng,J., Han,J., and Yang,X.J. (1999) HDAC4, a human histone deacetylase related to yeast HDA1, is a transcriptional corepressor. *Mol.Cell Biol.*, 19, 7816-7827.
236. Zhou,X., Marks,P.A., Rifkind,R.A., and Richon,V.M. (2001) Cloning and characterization of a histone deacetylase, HDAC9. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 98, 10572-10577.
237. Shore,D. (2000) The Sir2 protein family: A novel deacetylase for gene silencing and more. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 97, 14030-14032.
238. Gao,L., Cueto,M.A., Asselbergs,F., and Atadja,P. (2002) Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. *J.Biol.Chem.*, 277, 25748-25755.
239. Gregoret,I.V., Lee,Y.M., and Goodson,H.V. (2004) Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *J.Mol.Biol.*, 338, 17-31.
240. Hendrich,B. and Bickmore,W. (2001) Human diseases with underlying defects in chromatin structure and modification. *Hum.Mol.Genet.*, 10, 2233-2242.
241. Waterborg,J.H. (2002) Dynamics of histone acetylation in vivo. A function for acetylation turnover? *Biochem.Cell Biol.*, 80, 363-378.
242. 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., and Kim,K.W. (2001) Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes. *Nat.Med.*, 7, 437-443.
243. Johnstone,R.W. (2002) Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nat.Rev.Drug Discov.*, 1, 287-299.
244. Grignani,F., De Matteis,S., Nervi,C., Tomassoni,L., Gelmetti,V., Ciocce,M., Fanelli,M., Ruthardt,M., Ferrara,F.F., Zamir,I., Seiser,C., Grignani,F., Lazar,M.A., Minucci,S., and Pelicci,P.G. (1998) Fusion proteins of the retinoic acid receptor-alpha recruit histone deacetylase in promyelocytic leukaemia. *Nature*, 391, 815-818.
245. Lin,R.J., Nagy,L., Inoue,S., Shao,W., Miller,W.H., Jr., and Evans,R.M. (1998) Role of the histone deacetylase complex in acute promyelocytic leukaemia. *Nature*, 391, 811-814.
246. Choi,J.H., Kwon,H.J., Yoon,B.I., Kim,J.H., Han,S.U., Joo,H.J., and Kim,D.Y. (2001) Expression profile of histone deacetylase 1 in gastric cancer tissues. *Jpn.J.Cancer Res.*, 92, 1300-1304.

247. Toh, Y., Yamamoto, M., Endo, K., Ikeda, Y., Baba, H., Kohnoe, S., Yonemasu, H., Hachitanda, Y., Okamura, T., and Sugimachi, K. (2003) Histone H4 acetylation and histone deacetylase 1 expression in esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol.Rep.*, 10, 333-338.
248. Zhu, P., Martin, E., Mengwasser, J., Schlag, P., Janssen, K.P., and Gottlicher, M. (2004) Induction of HDAC2 expression upon loss of APC in colorectal tumorigenesis. *Cancer Cell*, 5, 455-463.
249. Rossig, L., Li, H., Fisslthaler, B., Urbich, C., Fleming, I., Forstermann, U., Zeiher, A.M., and Dimmeler, S. (2002) Inhibitors of histone deacetylation downregulate the expression of endothelial nitric oxide synthase and compromise endothelial cell function in vasorelaxation and angiogenesis. *Circ.Res.*, 91, 837-844.
250. Barnard, J.A. and Warwick, G. (1993) Butyrate rapidly induces growth inhibition and differentiation in HT-29 cells. *Cell Growth Differ.*, 4, 495-501.
251. Park, W.H., Jung, C.W., Park, J.O., Kim, K., Kim, W.S., Im, Y.H., Lee, M.H., Kang, W.K., and Park, K. (2003) Trichostatin inhibits the growth of ACHN renal cell carcinoma cells via cell cycle arrest in association with p27, or apoptosis. *Int.J.Oncol.*, 22, 1129-1134.
252. Ruemmele, F.M., Schwartz, S., Seidman, E.G., Dionne, S., Levy, E., and Lentze, M.J. (2003) Butyrate induced Caco-2 cell apoptosis is mediated via the mitochondrial pathway. *Gut*, 52, 94-100.
253. Sawa, H., Murakami, H., Ohshima, Y., Sugino, T., Nakajyo, T., Kisanuki, T., Tamura, Y., Satone, A., Ide, W., Hashimoto, I., and Kamada, H. (2001) Histone deacetylase inhibitors such as sodium butyrate and trichostatin A induce apoptosis through an increase of the bcl-2-related protein Bad. *Brain Tumor Pathol.*, 18, 109-114.
254. Sawa, H., Murakami, H., Kumagai, M., Nakasato, M., Yamauchi, S., Matsuyama, N., Tamura, Y., Satone, A., Ide, W., Hashimoto, I., and Kamada, H. (2004) Histone deacetylase inhibitor, FK228, induces apoptosis and suppresses cell proliferation of human glioblastoma cells in vitro and in vivo. *Acta Neuropathol.(Berl)*, 107, 523-531.
255. Carmeliet, P., Dor, Y., Herbert, J.M., Fukumura, D., Brusselmans, K., Dewerchin, M., Neeman, M., Bono, F., Abramovitch, R., Maxwell, P., Koch, C.J., Ratcliffe, P., Moons, L., Jain, R.K., Collen, D., and Keshert, E. (1998) Role of HIF-1alpha in hypoxia-mediated apoptosis, cell proliferation and tumour angiogenesis. *Nature*, 394, 485-490.
256. He, L.Z., Tolentino, T., Grayson, P., Zhong, S., Warrell, R.P., Jr., Rifkind, R.A., Marks, P.A., Richon, V.M., and Pandolfi, P.P. (2001) Histone deacetylase inhibitors induce remission in transgenic models of therapy-resistant acute promyelocytic leukemia. *J.Clin.Invest*, 108, 1321-1330.
257. Cress, W.D. and Seto, E. (2000) Histone deacetylases, transcriptional control, and cancer. *J.Cell Physiol*, 184, 1-16.
258. Torchia, J., Glass, C., and Rosenfeld, M.G. (1998) Co-activators and co-repressors in the integration of transcriptional responses. *Curr.Opin.Cell Biol.*, 10, 373-383.

259. Sambucetti,L.C., Fischer,D.D., Zabludoff,S., Kwon,P.O., Chamberlin,H., Trogani,N., Xu,H., and Cohen,D. (1999) Histone deacetylase inhibition selectively alters the activity and expression of cell cycle proteins leading to specific chromatin acetylation and antiproliferative effects. *J.Biol.Chem.*, 274, 34940-34947.
260. Butler,L.M., Webb,Y., Agus,D.B., Higgins,B., Tolentino,T.R., Kutko,M.C., LaQuaglia,M.P., Drobnjak,M., Cordon-Cardo,C., Scher,H.I., Breslow,R., Richon,V.M., Rifkind,R.A., and Marks,P.A. (2001) Inhibition of transformed cell growth and induction of cellular differentiation by pyroxamide, an inhibitor of histone deacetylase. *Clin.Cancer Res.*, 7, 962-970.
261. Jung,M., Brosch,G., Kolle,D., Scherf,H., Gerhauser,C., and Loidl,P. (1999) Amide analogues of trichostatin A as inhibitors of histone deacetylase and inducers of terminal cell differentiation. *J.Med.Chem.*, 42, 4669-4679.
262. Marks,P.A., Richon,V.M., Breslow,R., and Rifkind,R.A. (2001) Histone deacetylase inhibitors as new cancer drugs. *Curr.Opin.Oncol.*, 13, 477-483.
263. Marks,P.A., Richon,V.M., and Rifkind,R.A. (2000) Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells. *J.Natl.Cancer Inst.*, 92, 1210-1216.
264. Butler,L.M., Agus,D.B., Scher,H.I., Higgins,B., Rose,A., Cordon-Cardo,C., Thaler,H.T., Rifkind,R.A., Marks,P.A., and 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.
265. Sasakawa,Y., Naoe,Y., Inoue,T., Sasakawa,T., Matsuo,M., Manda,T., and Mutoh,S. (2002) Effects of FK228, a novel histone deacetylase inhibitor, on human lymphoma U-937 cells in vitro and in vivo. *Biochem.Pharmacol.*, 64, 1079-1090.
266. Kwon,H.J., Kim,M.S., Kim,M.J., Nakajima,H., and Kim,K.W. (2002) Histone deacetylase inhibitor FK228 inhibits tumor angiogenesis. *Int.J.Cancer*, 97, 290-296.
267. Mie,L.Y., Kim,S.H., Kim,H.S., Jin,S.M., Nakajima,H., Jeong,K.H., and Kim,K.W. (2003) Inhibition of hypoxia-induced angiogenesis by FK228, a specific histone deacetylase inhibitor, via suppression of HIF-1alpha activity. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 300, 241-246.
268. Kouraklis,G. and Theocharis,S. (2002) Histone deacetylase inhibitors and anticancer therapy. *Curr.Med.Chem.Anti.-Canc.Agents*, 2, 477-484.
269. Marks,P., Rifkind,R.A., Richon,V.M., Breslow,R., Miller,T., and Kelly,W.K. (2001) Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat.Rev.Cancer*, 1, 194-202.
270. Deroanne,C.F., Bonjean,K., Servotte,S., Devy,L., Colige,A., Clause,N., Blacher,S., Verdin,E., Foidart,J.M., Nusgens,B.V., and Castronovo,V. (2002) Histone deacetylases inhibitors as anti-angiogenic agents altering vascular endothelial growth factor signaling. *Oncogene*, 21, 427-436.
271. Michaelis,M., Michaelis,U.R., Fleming,I., Suhan,T., Cinatl,J., Blaheta,R.A., Hoffmann,K., Kotchetkov,R., Busse,R., Nau,H., and Cinatl,J., Jr. (2004) Valproic acid inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Mol.Pharmacol.*, 65, 520-527.

272. Pellizzaro,C., Coradini,D., and Daidone,M.G. (2002) Modulation of angiogenesis-related proteins synthesis by sodium butyrate in colon cancer cell line HT29. *Carcinogenesis*, 23, 735-740.
273. Burton Beverly S. On the propyl derivatives and decomposition products of ethyl acetoacetate. *Am Chem J* (3), 385-395. 1882.
274. Carraz,G. (1967) [Approach to a theory on the activity of the di-n-propylacetic structure]. *Agressologie*, 8, 13-20.
275. Chapman,A., Keane,P.E., Meldrum,B.S., Simiand,J., and Vernieres,J.C. (1982) Mechanism of anticonvulsant action of valproate. *Prog.Neurobiol.*, 19, 315-359.
276. Trojnar,M.K., Wierzchowska-Cioch,E., Krzyzanowski,M., Jargiello,M., and Czuczwar,S.J. (2004) New generation of valproic acid. *Pol.J.Pharmacol.*, 56, 283-288.
277. Spina,E. and Perugi,G. (2004) Antiepileptic drugs: indications other than epilepsy. *Epileptic.Disord.*, 6, 57-75.
278. Nau,H., Hauck,R.S., and Ehlers,K. (1991) Valproic acid-induced neural tube defects in mouse and human: aspects of chirality, alternative drug development, pharmacokinetics and possible mechanisms. *Pharmacol.Toxicol.*, 69, 310-321.
279. Gottlicher,M., Minucci,S., Zhu,P., Kramer,O.H., Schimpf,A., Giavara,S., Sleeman,J.P., Lo,C.F., Nervi,C., Pelicci,P.G., and Heinzl,T. (2001) Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J.*, 20, 6969-6978.
280. Phiel,C.J., Zhang,F., Huang,E.Y., Guenther,M.G., Lazar,M.A., and Klein,P.S. (2001) Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *J.Biol.Chem.*, 276, 36734-36741.
281. Gottlicher,M. (2004) Valproic acid: an old drug newly discovered as inhibitor of histone deacetylases. *Ann.Hematol.*, 83 Suppl 1, S91-S92.
282. Cinatl,J., Jr., Cinatl,J., Scholz,M., Driever,P.H., Henrich,D., Kabickova,H., Vogel,J.U., Doerr,H.W., and Kornhuber,B. (1996) Antitumor activity of sodium valproate in cultures of human neuroblastoma cells. *Anticancer Drugs*, 7, 766-773.
283. Driever,P.H., Knupfer,M.M., Cinatl,J., and Wolff,J.E. (1999) Valproic acid for the treatment of pediatric malignant glioma. *Klin.Padiatr.*, 211, 323-328.
284. Cinatl,J., Jr., Cinatl,J., Driever,P.H., Kotchetkov,R., Pouckova,P., Kornhuber,B., and Schwabe,D. (1997) Sodium valproate inhibits in vivo growth of human neuroblastoma cells. *Anticancer Drugs*, 8, 958-963.
285. Cinatl,J., Jr., Kotchetkov,R., Blaheta,R., Driever,P.H., Vogel,J.U., and Cinatl,J. (2002) Induction of differentiation and suppression of malignant phenotype of human neuroblastoma BE(2)-C cells by valproic acid: enhancement by combination with interferon-alpha. *Int.J.Oncol.*, 20, 97-106.

286. Witt,O., Schweigerer,L., Driever,P.H., Wolff,J., and Pekrun,A. (2004) Valproic acid treatment of glioblastoma multiforme in a child. *Pediatr.Blood Cancer*, 43, 181.
287. Scheppach,W., Bartram,P., Richter,A., Richter,F., Liepold,H., Dusel,G., Hofstetter,G., Ruthlein,J., and Kasper,H. (1992) Effect of short-chain fatty acids on the human colonic mucosa in vitro. *JPEN J.Parenter.Enteral Nutr.*, 16, 43-48.
288. Scheppach,W. (1994) Effects of short chain fatty acids on gut morphology and function. *Gut*, 35, S35-S38.
289. Scheppach,W., Bartram,H.P., and Richter,F. (1995) Role of short-chain fatty acids in the prevention of colorectal cancer. *Eur.J.Cancer*, 31A, 1077-1080.
290. Milovic,V., Teller,I.C., Turchanowa,L., Caspary,W.F., and Stein,J. (2000) Effect of structural analogues of propionate and butyrate on colon cancer cell growth. *Int.J.Colorectal Dis.*, 15, 264-270.
291. Whitehead,R.H., Young,G.P., and Bhathal,P.S. (1986) Effects of short chain fatty acids on a new human colon carcinoma cell line (LIM1215). *Gut*, 27, 1457-1463.
292. Gaschott,T., Wachtershauser,A., Steinhilber,D., and Stein,J. (2001) 1,25-Dihydroxycholecalciferol enhances butyrate-induced p21(Waf1/Cip1) expression. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 283, 80-85.
293. Gaschott,T. and Stein,J. (2003) Short-chain fatty acids and colon cancer cells: the vitamin D receptor--butyrate connection. *Recent Results Cancer Res.*, 164, 247-257.
294. Hague,A., Elder,D.J., Hicks,D.J., and Paraskeva,C. (1995) Apoptosis in colorectal tumour cells: induction by the short chain fatty acids butyrate, propionate and acetate and by the bile salt deoxycholate. *Int.J.Cancer*, 60, 400-406.
295. Heerdt,B.G., Houston,M.A., and Augenlicht,L.H. (1997) Short-chain fatty acid-initiated cell cycle arrest and apoptosis of colonic epithelial cells is linked to mitochondrial function. *Cell Growth Differ.*, 8, 523-532.
296. Hinnebusch,B.F., Meng,S., Wu,J.T., Archer,S.Y., and Hodin,R.A. (2002) The effects of short-chain fatty acids on human colon cancer cell phenotype are associated with histone hyperacetylation. *J.Nutr.*, 132, 1012-1017.
297. Marchetti,M.C., Migliorati,G., Moraca,R., Riccardi,C., Nicoletti,I., Fabiani,R., Mastrandrea,V., and Morozzi,G. (1997) Possible mechanisms involved in apoptosis of colon tumor cell lines induced by deoxycholic acid, short-chain fatty acids, and their mixtures. *Nutr.Cancer*, 28, 74-80.
298. McBain,J.A., Eastman,A., Nobel,C.S., and Mueller,G.C. (1997) Apoptotic death in adenocarcinoma cell lines induced by butyrate and other histone deacetylase inhibitors. *Biochem.Pharmacol.*, 53, 1357-1368.
299. Morita,A., Tsao,D., and Kim,Y.S. (1982) Effect of sodium butyrate on alkaline phosphatase in HRT-18, a human rectal cancer cell line. *Cancer Res.*, 42, 4540-4545.

300. Otaka,M., Singhal,A., and Hakomori,S. (1989) Antibody-mediated targeting of differentiation inducers to tumor cells: inhibition of colonic cancer cell growth in vitro and in vivo. A preliminary note. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 158, 202-208.
301. Schroder,O., Hess,S., Caspary,W.F., and Stein,J. (1999) Mediation of differentiating effects of butyrate on the intestinal cell line Caco-2 by transforming growth factor-beta 1. *Eur.J.Nutr.*, 38, 45-50.
302. Wu,J.T., Archer,S.Y., Hinnebusch,B., Meng,S., and Hodin,R.A. (2001) Transient vs. prolonged histone hyperacetylation: effects on colon cancer cell growth, differentiation, and apoptosis. *Am.J.Physiol Gastrointest.Liver Physiol*, 280, G482-G490.
303. Daniel,C., Schroder,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.
304. Kruh,J. (1982) Effects of sodium butyrate, a new pharmacological agent, on cells in culture. *Mol.Cell Biochem.*, 42, 65-82.
305. Taylor,C.W., Kim,Y.S., Childress-Fields,K.E., and Yeoman,L.C. (1992) Sensitivity of nuclear c-myc levels and induction to differentiation-inducing agents in human colon tumor cell lines. *Cancer Lett.*, 62, 95-105.
306. Augeron,C. and Laboisie,C.L. (1984) Emergence of permanently differentiated cell clones in a human colonic cancer cell line in culture after treatment with sodium butyrate. *Cancer Res.*, 44, 3961-3969.
307. Medina,V., Afonso,J.J., Alvarez-Arguelles,H., Hernandez,C., and Gonzalez,F. (1998) Sodium butyrate inhibits carcinoma development in a 1,2-dimethylhydrazine-induced rat colon cancer. *JPEN J.Parenter.Enteral Nutr.*, 22, 14-17.
308. McIntyre,A., Gibson,P.R., and Young,G.P. (1993) Butyrate production from dietary fibre and protection against large bowel cancer in a rat model. *Gut*, 34, 386-391.
309. Santini,V., Gozzini,A., Scappini,B., Grossi,A., and Rossi,F.P. (2001) Searching for the magic bullet against cancer: the butyrate saga. *Leuk.Lymphoma*, 42, 275-289.
310. Sealy,L. and Chalkley,R. (1978) The effect of sodium butyrate on histone modification. *Cell*, 14, 115-121.
311. Chen,Y.X., Fang,J.Y., Zhu,H.Y., Lu,R., Cheng,Z.H., and Qiu,D.K. (2004) Histone acetylation regulates p21WAF1 expression in human colon cancer cell lines. *World J.Gastroenterol.*, 10, 2643-2646.
312. Somech,R., Izraeli,S., and Simon,J. (2004) Histone deacetylase inhibitors--a new tool to treat cancer. *Cancer Treat.Rev.*, 30, 461-472.
313. Tsuji,N., Kobayashi,M., Nagashima,K., Wakisaka,Y., and Koizumi,K. (1976) A new antifungal antibiotic, trichostatin. *J.Antibiot.(Tokyo)*, 29, 1-6.

314. Yoshida,M., Kijima,M., Akita,M., and Beppu,T. (1990) Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J.Biol.Chem.*, 265, 17174-17179.
315. Kijima,M., Yoshida,M., Sugita,K., Horinouchi,S., and Beppu,T. (1993) Trapoxin, an antitumor cyclic tetrapeptide, is an irreversible inhibitor of mammalian histone deacetylase. *J.Biol.Chem.*, 268, 22429-22435.
316. Hoshikawa,Y., Kwon,H.J., Yoshida,M., Horinouchi,S., and Beppu,T. (1994) Trichostatin A induces morphological changes and gelsolin expression by inhibiting histone deacetylase in human carcinoma cell lines. *Exp.Cell Res.*, 214, 189-197.
317. Niki,T., Rombouts,K., De Bleser,P., De Smet,K., Rogiers,V., Schuppan,D., Yoshida,M., Gabbiani,G., and Geerts,A. (1999) A histone deacetylase inhibitor, trichostatin A, suppresses myofibroblastic differentiation of rat hepatic stellate cells in primary culture. *Hepatology*, 29, 858-867.
318. 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., and Delorme,D. (2002) Structurally simple trichostatin A-like straight chain hydroxamates as potent histone deacetylase inhibitors. *J.Med.Chem.*, 45, 2877-2885.
319. Wang,Z.M., Hu,J., Zhou,D., Xu,Z.Y., Panasci,L.C., and Chen,Z.P. (2002) Trichostatin A inhibits proliferation and induces expression of p21WAF and p27 in human brain tumor cell lines. *Ai.Zheng.*, 21, 1100-1105.
320. Finzer,P., Kuntzen,C., Soto,U., zur,H.H., and Rosl,F. (2001) Inhibitors of histone deacetylase arrest cell cycle and induce apoptosis in cervical carcinoma cells circumventing human papillomavirus oncogene expression. *Oncogene*, 20, 4768-4776.
321. Lavelle,D., Chen,Y.H., Hankewych,M., and DeSimone,J. (2001) Histone deacetylase inhibitors increase p21(WAF1) and induce apoptosis of human myeloma cell lines independent of decreased IL-6 receptor expression. *Am.J.Hematol.*, 68, 170-178.
322. Herold,C., Ganslmayer,M., Ocker,M., Hermann,M., Geerts,A., Hahn,E.G., and Schuppan,D. (2002) The histone-deacetylase inhibitor Trichostatin A blocks proliferation and triggers apoptotic programs in hepatoma cells. *J.Hepatol.*, 36, 233-240.
323. Vigushin,D.M., Ali,S., Pace,P.E., Mirsaidi,N., Ito,K., Adcock,I., and 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.
324. Wittich,S., Scherf,H., Xie,C., Brosch,G., Loidl,P., Gerhauser,C., and Jung,M. (2002) Structure-activity relationships on phenylalanine-containing inhibitors of histone deacetylase: in vitro enzyme inhibition, induction of differentiation, and inhibition of proliferation in Friend leukemic cells. *J.Med.Chem.*, 45, 3296-3309.
325. Yoshida,M., Nomura,S., and Beppu,T. (1987) Effects of trichostatins on differentiation of murine erythroleukemia cells. *Cancer Res.*, 47, 3688-3691.

326. Yoshida,M., Horinouchi,S., and Beppu,T. (1995) Trichostatin A and trapoxin: novel chemical probes for the role of histone acetylation in chromatin structure and function. *Bioessays*, 17, 423-430.
327. Fogh,J., Wright,W.C., and Loveless,J.D. (1977) Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J Natl.Cancer Inst.*, 58, 209-214.
328. Hillgren,K.M., Kato,A., and Borchardt,R.T. (1995) In vitro systems for studying intestinal drug absorption. *Med.Res.Rev.*, 15, 83-109.
329. Zweibaum,A., Triadou,N., Kedinger,M., Augeron,C., Robine-Leon,S., Pinto,M., Rousset,M., and Haffen,K. (1983) Sucrase-isomaltase: a marker of foetal and malignant epithelial cells of the human colon. *Int.J Cancer*, 32, 407-412.
330. Hidalgo,I.J., Raub,T.J., and Borchardt,R.T. (1989) Characterization of the human colon carcinoma cell line (Caco-2) as a model system for intestinal epithelial permeability. *Gastroenterology*, 96, 736-749.
331. Gifford,S.M., Grummer,M.A., Pierre,S.A., Austin,J.L., Zheng,J., and Bird,I.M. (2004) Functional characterization of HUVEC-CS: Ca<sup>2+</sup> signaling, ERK 1/2 activation, mitogenesis and vasodilator production. *J Endocrinol.*, 182, 485-499.
332. Hughes,S.E. (1996) Functional characterization of the spontaneously transformed human umbilical vein endothelial cell line ECV304: use in an in vitro model of angiogenesis. *Exp.Cell Res.*, 225, 171-185.
333. 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.
334. Towbin,H., Staehelin,T., and 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.
335. Laemmli,U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature*, 227, 680-685.
336. Saiki,R.K., Bugawan,T.L., Horn,G.T., Mullis,K.B., and Erlich,H.A. (1986) Analysis of enzymatically amplified beta-globin and HLA-DQ alpha DNA with allele-specific oligonucleotide probes. *Nature*, 324, 163-166.
337. Wieslander,L. (1993) [The PCR method and directed mutagenesis. What significance do discoveries by chemistry Nobel Prize winners have for medicine?]. *Lakartidningen*, 90, 4088, 4091.
338. Trapnell,B.C. (1993) Quantitative evaluation of gene expression in freshly isolated human respiratory epithelial cells. *Am J Physiol*, 264, L199-L212.
339. Apostolakos,M.J., Schuermann,W.H., Frampton,M.W., Utell,M.J., and Willey,J.C. (1993) Measurement of gene expression by multiplex competitive polymerase chain reaction. *Anal.Biochem.*, 213, 277-284.

340. Loitsch,S.M., Kippenberger,S., Dauletbaev,N., Wagner,T.O., and Bargon,J. (1999) Reverse transcription-competitive multiplex PCR improves quantification of mRNA in clinical samples--application to the low abundance CFTR mRNA. *Clin.Chem*, 45, 619-624.
341. Chomczynski,P. and Sacchi,N. (1987) Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. *Anal.Biochem.*, 162, 156-159.
342. Celi,F.S., Zenilman,M.E., and Shuldiner,A.R. (1993) A rapid and versatile method to synthesize internal standards for competitive PCR. *Nucleic Acids Res.*, 21, 1047.
343. Orino,E., Tanaka,K., Tamura,T., Sone,S., Ogura,T., and Ichihara,A. (1991) ATP-dependent reversible association of proteasomes with multiple protein components to form 26S complexes that degrade ubiquitinated proteins in human HL-60 cells. *FEBS Lett.*, 284, 206-210.
344. Westergren-Thorsson,G., Onnervik,P.O., Fransson,L.A., and Malmstrom,A. (1991) Proliferation of cultured fibroblasts is inhibited by L-iduronate-containing glycosaminoglycans. *J Cell Physiol*, 147, 523-530.
345. Huang,L.E., Gu,J., Schau,M., and Bunn,H.F. (1998) Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha is mediated by an O2-dependent degradation domain via the ubiquitin-proteasome pathway. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 95, 7987-7992.
346. Kramer,O.H., Gottlicher,M., and Heinzl,T. (2001) Histone deacetylase as a therapeutic target. *Trends Endocrinol.Metab*, 12, 294-300.
347. Kramer,O.H., Zhu,P., Ostendorff,H.P., Golebiewski,M., Tiefenbach,J., Peters,M.A., Brill,B., Groner,B., Bach,I., Heinzl,T., and Gottlicher,M. (2003) The histone deacetylase inhibitor valproic acid selectively induces proteasomal degradation of HDAC2. *EMBO J.*, 22, 3411-3420.
348. Richon,V.M., Emiliani,S., Verdin,E., Webb,Y., Breslow,R., Rifkind,R.A., and Marks,P.A. (1998) A class of hybrid polar inducers of transformed cell differentiation inhibits histone deacetylases. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 95, 3003-3007.
349. Ogawa,H., Rafiee,P., Fisher,P.J., Johnson,N.A., Otterson,M.F., and Binion,D.G. (2003) Sodium butyrate inhibits angiogenesis of human intestinal microvascular endothelial cells through COX-2 inhibition. *FEBS Lett.*, 554, 88-94.
350. Zgouras,D., Wächtershäuser,A., Frings,D., and Stein,J. (2003) Butyrate impairs intestinal tumor cell-induced angiogenesis by inhibiting HIF-1alpha nuclear translocation. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 300, 832-838.
351. Wächtershäuser,A., Zores,M., and Stein,J. (2005) 4-Bromo-butyrate selectively induced p27-expression without effecting cell cycle arrest. *submitted*.
352. Gospodarowicz,D. (1990) Fibroblast growth factor. Chemical structure and biologic function. *Clin.Orthop.Relat Res.*,231-248.
353. Montesano,R., Vassalli,J.D., Baird,A., Guillemin,R., and Orci,L. (1986) Basic fibroblast growth factor induces angiogenesis in vitro. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 83, 7297-7301.

354. Sato, Y., Hamanaka, R., Ono, J., Kuwano, M., Rifkin, D.B., and Takaki, R. (1991) The stimulatory effect of PDGF on vascular smooth muscle cell migration is mediated by the induction of endogenous basic FGF. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 174, 1260-1266.
355. Berger, A.P., Kofler, K., Bektic, J., Rogatsch, H., Steiner, H., Bartsch, G., and Klocker, H. (2003) Increased growth factor production in a human prostatic stromal cell culture model caused by hypoxia. *Prostate*, 57, 57-65.
356. Ishibashi, H., Shiratuchi, T., Nakagawa, K., Onimaru, M., Sugiura, T., Sueishi, K., and Shirasuna, K. (2001) Hypoxia-induced angiogenesis of cultured human salivary gland carcinoma cells enhances vascular endothelial growth factor production and basic fibroblast growth factor release. *Oral Oncol.*, 37, 77-83.
357. Baffour, R., Berman, J., Garb, J.L., Rhee, S.W., Kaufman, J., and Friedmann, P. (1992) Enhanced angiogenesis and growth of collaterals by in vivo administration of recombinant basic fibroblast growth factor in a rabbit model of acute lower limb ischemia: dose-response effect of basic fibroblast growth factor. *J. Vasc. Surg.*, 16, 181-191.
358. Doll, J.A., Reiher, F.K., Crawford, S.E., Pins, M.R., Campbell, S.C., and Bouck, N.P. (2001) Thrombospondin-1, vascular endothelial growth factor and fibroblast growth factor-2 are key functional regulators of angiogenesis in the prostate. *Prostate*, 49, 293-305.
359. Samaniego, F., Markham, P.D., Gallo, R.C., and Ensoli, B. (1995) Inflammatory cytokines induce AIDS-Kaposi's sarcoma-derived spindle cells to produce and release basic fibroblast growth factor and enhance Kaposi's sarcoma-like lesion formation in nude mice. *J. Immunol.*, 154, 3582-3592.
360. Chang, J., Most, D., Bresnick, S., Mehrara, B., Steinbrech, D.S., Reinisch, J., Longaker, M.T., and Turk, A.E. (1999) Proliferative hemangiomas: analysis of cytokine gene expression and angiogenesis. *Plast. Reconstr. Surg.*, 103, 1-9.
361. Bian, X., Chen, Z., Guo, D., Du, L., Xin, R., and Shi, J. (1999) [Expression of angiogenic factors and cell cycle regulation factors in human glioblastoma cell line SHG-44]. *Zhonghua Bing. Li Xue. Za Zhi.*, 28, 178-181.
362. Zhang, Y., Shang, H., Sun, L.G., Liu, N., and Yu, H.Y. (2003) [Expression of aFGF and bFGF in ovarian cancer and their effect on ovarian cancer cell proliferation]. *Ai. Zheng.*, 22, 1162-1165.
363. Giri, D., Ropiquet, F., and Ittmann, M. (1999) Alterations in expression of basic fibroblast growth factor (FGF) 2 and its receptor FGFR-1 in human prostate cancer. *Clin. Cancer Res.*, 5, 1063-1071.
364. Hughes, C.J., Reed, J.A., Cabal, R., Huvos, A.G., Albino, A.P., and Schantz, S.P. (1994) Increased expression of basic fibroblast growth factor in squamous carcinogenesis of the head and neck is less prevalent following smoking cessation. *Am. J. Surg.*, 168, 381-385.

365. Partridge,M., Kiguwa,S., Luqmani,Y., and Langdon,J.D. (1996) Expression of bFGF, KGF and FGF receptors on normal oral mucosa and SCC. *Eur.J.Cancer B Oral Oncol.*, 32B, 76-82.
366. Yamanaka,Y., Friess,H., Buchler,M., Beger,H.G., Uchida,E., Onda,M., Kobrin,M.S., and Korc,M. (1993) Overexpression of acidic and basic fibroblast growth factors in human pancreatic cancer correlates with advanced tumor stage. *Cancer Res.*, 53, 5289-5296.
367. Czubayko,F., Liaudet-Coopman,E.D., Aigner,A., Tuveson,A.T., Berchem,G.J., and Wellstein,A. (1997) A secreted FGF-binding protein can serve as the angiogenic switch in human cancer. *Nat.Med.*, 3, 1137-1140.
368. Rak,J. and Kerbel,R.S. (1997) bFGF and tumor angiogenesis--back in the limelight? *Nat.Med.*, 3, 1083-1084.
369. Ray,R., Cabal-Manzano,R., Moser,A.R., Waldman,T., Zipper,L.M., Aigner,A., Byers,S.W., Riegel,A.T., and Wellstein,A. (2003) Up-regulation of fibroblast growth factor-binding protein, by beta-catenin during colon carcinogenesis. *Cancer Res.*, 63, 8085-8089.
370. New,B.A. and Yeoman,L.C. (1992) Identification of basic fibroblast growth factor sensitivity and receptor and ligand expression in human colon tumor cell lines. *J.Cell Physiol*, 150, 320-326.
371. Leith,J.T., Papa,G., Quaranto,L., and Michelson,S. (1992) Modification of the volumetric growth responses and steady-state hypoxic fractions of xenografted DLD-2 human colon carcinomas by administration of basic fibroblast growth factor or suramin. *Br.J.Cancer*, 66, 345-348.
372. Landriscina,M., Cassano,A., Ratto,C., Longo,R., Ippoliti,M., Palazzotti,B., Crucitti,F., and Barone,C. (1998) Quantitative analysis of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in human colorectal cancer. *Br.J.Cancer*, 78, 765-770.
373. Neufeld,G., Cohen,T., Gengrinovitch,S., and Poltorak,Z. (1999) Vascular endothelial growth factor (VEGF) and its receptors. *FASEB J.*, 13, 9-22.
374. Mattern,J., Koomagi,R., and Volm,M. (1996) Association of vascular endothelial growth factor expression with intratumoral microvessel density and tumour cell proliferation in human epidermoid lung carcinoma. *Br.J.Cancer*, 73, 931-934.
375. Viglietto,G., Maglione,D., Rambaldi,M., Cerutti,J., Romano,A., Trapasso,F., Fedele,M., Ippolito,P., Chiappetta,G., Botti,G., and . (1995) Upregulation of vascular endothelial growth factor (VEGF) and downregulation of placenta growth factor (PIGF) associated with malignancy in human thyroid tumors and cell lines. *Oncogene*, 11, 1569-1579.
376. Brown,L.F., Berse,B., Jackman,R.W., Tognazzi,K., Manseau,E.J., Dvorak,H.F., and Senger,D.R. (1993) Increased expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in kidney and bladder carcinomas. *Am.J.Pathol.*, 143, 1255-1262.

377. Yoshiji,H., Gomez,D.E., Shibuya,M., and Thorgeirsson,U.P. (1996) Expression of vascular endothelial growth factor, its receptor, and other angiogenic factors in human breast cancer. *Cancer Res.*, 56, 2013-2016.
378. Berkman,R.A., Merrill,M.J., Reinhold,W.C., Monacci,W.T., Saxena,A., Clark,W.C., Robertson,J.T., Ali,I.U., and Oldfield,E.H. (1993) Expression of the vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor gene in central nervous system neoplasms. *J.Clin.Invest*, 91, 153-159.
379. Plate,K.H., Breier,G., Weich,H.A., Mennel,H.D., and Risau,W. (1994) Vascular endothelial growth factor and glioma angiogenesis: coordinate induction of VEGF receptors, distribution of VEGF protein and possible in vivo regulatory mechanisms. *Int.J.Cancer*, 59, 520-529.
380. Battegay,E.J. (1995) Angiogenesis: mechanistic insights, neovascular diseases, and therapeutic prospects. *J.Mol.Med.*, 73, 333-346.
381. Graeven,U., Rodeck,U., Karpinski,S., Jost,M., Philippou,S., and Schmiegel,W. (2001) Modulation of angiogenesis and tumorigenicity of human melanocytic cells by vascular endothelial growth factor and basic fibroblast growth factor. *Cancer Res.*, 61, 7282-7290.
382. Ferrara,N., Houck,K., Jakeman,L., and Leung,D.W. (1992) Molecular and biological properties of the vascular endothelial growth factor family of proteins. *Endocr.Rev.*, 13, 18-32.
383. Ferrara,N., Winer,J., Burton,T., Rowland,A., Siegel,M., Phillips,H.S., Terrell,T., Keller,G.A., and Levinson,A.D. (1993) Expression of vascular endothelial growth factor does not promote transformation but confers a growth advantage in vivo to Chinese hamster ovary cells. *J.Clin.Invest*, 91, 160-170.
384. Qu,H., Nagy,J.A., Senger,D.R., Dvorak,H.F., and Dvorak,A.M. (1995) Ultrastructural localization of vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor (VPF/VEGF) to the abluminal plasma membrane and vesiculovacuolar organelles of tumor microvascular endothelium. *J.Histochem.Cytochem.*, 43, 381-389.
385. Poulaki,V., Mitsiades,C.S., McMullan,C., Sykoutri,D., Fanourakis,G., Kotoula,V., Tseleni-Balafouta,S., Koutras,D.A., and Mitsiades,N. (2003) Regulation of vascular endothelial growth factor expression by insulin-like growth factor I in thyroid carcinomas. *J.Clin.Endocrinol.Metab*, 88, 5392-5398.
386. Klein,M., Picard,E., Vignaud,J.M., Marie,B., Bresler,L., Toussaint,B., Weryha,G., Duprez,A., and Leclere,J. (1999) Vascular endothelial growth factor gene and protein: strong expression in thyroiditis and thyroid carcinoma. *J.Endocrinol.*, 161, 41-49.
387. Toi,M., Kondo,S., Suzuki,H., Yamamoto,Y., Inada,K., Imazawa,T., Taniguchi,T., and Tominaga,T. (1996) Quantitative analysis of vascular endothelial growth factor in primary breast cancer. *Cancer*, 77, 1101-1106.
388. Roberts,W.G. and Palade,G.E. (1997) Neovasculature induced by vascular endothelial growth factor is fenestrated. *Cancer Res.*, 57, 765-772.

389. Dvorak,A.M., Kohn,S., Morgan,E.S., Fox,P., Nagy,J.A., and Dvorak,H.F. (1996) The vesiculo-vacuolar organelle (VVO): a distinct endothelial cell structure that provides a transcellular pathway for macromolecular extravasation. *J.Leukoc.Biol.*, 59, 100-115.
390. Dvorak,H.F., Nagy,J.A., Berse,B., Brown,L.F., Yeo,K.T., Yeo,T.K., Dvorak,A.M., van de,W.L., Sioussat,T.M., and Senger,D.R. (1992) Vascular permeability factor, fibrin, and the pathogenesis of tumor stroma formation. *Ann.N.Y.Acad.Sci.*, 667, 101-111.
391. Kondo,S., Asano,M., and Suzuki,H. (1993) Significance of vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor for solid tumor growth, and its inhibition by the antibody. *Biochem.Biophys.Res.Comm.*, 194, 1234-1241.
392. Esser,S., Wolburg,K., Wolburg,H., Breier,G., Kurzchalia,T., and Risau,W. (1998) Vascular endothelial growth factor induces endothelial fenestrations in vitro. *J.Cell Biol.*, 140, 947-959.
393. Potgens,A.J., van Altena,M.C., Lubsen,N.H., Ruiten,D.J., and de Waal,R.M. (1996) Analysis of the tumor vasculature and metastatic behavior of xenografts of human melanoma cell lines transfected with vascular permeability factor. *Am.J.Pathol.*, 148, 1203-1217.
394. Roberts,W.G. and Hasan,T. (1993) Tumor-secreted vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor influences photosensitizer uptake. *Cancer Res.*, 53, 153-157.
395. Yuan,F., Chen,Y., Dellian,M., Safabakhsh,N., Ferrara,N., and Jain,R.K. (1996) Time-dependent vascular regression and permeability changes in established human tumor xenografts induced by an anti-vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor antibody. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 93, 14765-14770.
396. Gasparini,G., Toi,M., Gion,M., Verderio,P., Dittadi,R., Hanatani,M., Matsubara,I., Vinante,O., Bonoldi,E., Boracchi,P., Gatti,C., Suzuki,H., and Tominaga,T. (1997) Prognostic significance of vascular endothelial growth factor protein in node-negative breast carcinoma. *J.Natl.Cancer Inst.*, 89, 139-147.
397. Maeda,K., Chung,Y.S., Ogawa,Y., Takatsuka,S., Kang,S.M., Ogawa,M., Sawada,T., and Sowa,M. (1996) Prognostic value of vascular endothelial growth factor expression in gastric carcinoma. *Cancer*, 77, 858-863.
398. Linderholm,B.K., Lindh,B., Beckman,L., Erlanson,M., Edin,K., Travelin,B., Bergh,J., Grankvist,K., and Henriksson,R. (2003) Prognostic correlation of basic fibroblast growth factor and vascular endothelial growth factor in 1307 primary breast cancers. *Clin.Breast Cancer*, 4, 340-347.
399. Kondo,S., Asano,M., Matsuo,K., Ohmori,I., and Suzuki,H. (1994) Vascular endothelial growth factor/vascular permeability factor is detectable in the sera of tumor-bearing mice and cancer patients. *Biochim.Biophys.Acta*, 1221, 211-214.
400. Salven,P., Teerenhovi,L., and Joensuu,H. (1997) A high pretreatment serum vascular endothelial growth factor concentration is associated with poor outcome in non-Hodgkin's lymphoma. *Blood*, 90, 3167-3172.

401. Takigawa,N., Segawa,Y., Fujimoto,N., Hotta,K., and Eguchi,K. (1998) Elevated vascular endothelial growth factor levels in sera of patients with lung cancer. *Anticancer Res.*, 18, 1251-1254.
402. Brown,L.F., Berse,B., Jackman,R.W., Tognazzi,K., Manseau,E.J., Senger,D.R., and Dvorak,H.F. (1993) Expression of vascular permeability factor (vascular endothelial growth factor) and its receptors in adenocarcinomas of the gastrointestinal tract. *Cancer Res.*, 53, 4727-4735.
403. Cheung,N., Wong,M.P., Yuen,S.T., Leung,S.Y., and Chung,L.P. (1998) Tissue-specific expression pattern of vascular endothelial growth factor isoforms in the malignant transformation of lung and colon. *Hum.Pathol.*, 29, 910-914.
404. Wong,M.P., Cheung,N., Yuen,S.T., Leung,S.Y., and Chung,L.P. (1999) Vascular endothelial growth factor is up-regulated in the early pre-malignant stage of colorectal tumour progression. *Int.J.Cancer*, 81, 845-850.
405. Takahashi,Y., Kitadai,Y., Bucana,C.D., Cleary,K.R., and Ellis,L.M. (1995) Expression of vascular endothelial growth factor and its receptor, KDR, correlates with vascularity, metastasis, and proliferation of human colon cancer. *Cancer Res.*, 55, 3964-3968.
406. Warren,R.S., Yuan,H., Matli,M.R., Gillett,N.A., and Ferrara,N. (1995) Regulation by vascular endothelial growth factor of human colon cancer tumorigenesis in a mouse model of experimental liver metastasis. *J.Clin.Invest*, 95, 1789-1797.
407. Cascinu,S., Staccioli,M.P., Gasparini,G., Giordani,P., Catalano,V., Ghiselli,R., Rossi,C., Baldelli,A.M., Graziano,F., Saba,V., Muretto,P., and Catalano,G. (2000) Expression of vascular endothelial growth factor can predict event-free survival in stage II colon cancer. *Clin.Cancer Res.*, 6, 2803-2807.
408. Akbulut,H., Altuntas,F., Akbulut,K.G., Ozturk,G., Cindoruk,M., Unal,E., and Icli,F. (2002) Prognostic role of serum vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor and nitric oxide in patients with colorectal carcinoma. *Cytokine*, 20, 184-190.
409. De Vita,F., Orditura,M., Lieto,E., Infusino,S., Morgillo,F., Martinelli,E., Castellano,P., Romano,C., Ciardiello,F., Catalano,G., Pignatelli,C., and Galizia,G. (2004) Elevated perioperative serum vascular endothelial growth factor levels in patients with colon carcinoma. *Cancer*, 100, 270-278.
410. Hague,A., Manning,A.M., Hanlon,K.A., Huschtscha,L.I., Hart,D., and 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.
411. Pili,R., Kruszewski,M.P., Hager,B.W., Lantz,J., and Carducci,M.A. (2001) Combination of phenylbutyrate and 13-cis retinoic acid inhibits prostate tumor growth and angiogenesis. *Cancer Res.*, 61, 1477-1485.
412. Lambrecht,V., Le,B., X, Toillon,R.A., Boilly,B., and Hondermarck,H. (1998) Alterations in both heparan sulfate proteoglycans and mitogenic activity of fibroblast

- growth factor-2 are triggered by inhibitors of proliferation in normal and breast cancer epithelial cells. *Exp. Cell Res.*, 245, 239-244.
413. Sawa,H., Murakami,H., Ohshima,Y., Murakami,M., Yamazaki,I., Tamura,Y., Mima,T., Satone,A., Ide,W., Hashimoto,I., and Kamada,H. (2002) Histone deacetylase inhibitors such as sodium butyrate and trichostatin A inhibit vascular endothelial growth factor (VEGF) secretion from human glioblastoma cells. *Brain Tumor Pathol.*, 19, 77-81.
414. Acker,T. and Plate,K.H. (2002) A role for hypoxia and hypoxia-inducible transcription factors in tumor physiology. *J.Mol.Med.*, 80, 562-575.
415. Buchler,P., Reber,H.A., Buchler,M., Shrinkante,S., Buchler,M.W., Friess,H., Semenza,G.L., and Hines,O.J. (2003) Hypoxia-inducible factor 1 regulates vascular endothelial growth factor expression in human pancreatic cancer. *Pancreas*, 26, 56-64.
416. Stroka,D.M., Burkhardt,T., Desbaillets,I., Wenger,R.H., Neil,D.A., Bauer,C., Gassmann,M., and Candinas,D. (2001) HIF-1 is expressed in normoxic tissue and displays an organ-specific regulation under systemic hypoxia. *FASEB J.*, 15, 2445-2453.
417. 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., and Semenza,G.L. (1998) Cellular and developmental control of O<sub>2</sub> homeostasis by hypoxia-inducible factor 1 alpha. *Genes Dev.*, 12, 149-162.
418. Jiang,C.Q., Fan,L.F., Liu,Z.S., Qian,Q., Xia,D., Diao,L.M., He,Y.M., and 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.
419. Semenza,G.L. (2004) Intratumoral hypoxia, radiation resistance, and HIF-1. *Cancer Cell*, 5, 405-406.
420. Bos,R., van Diest,P.J., de Jong,J.S., van der,G.P., van,d., V, and van der,W.E. (2005) Hypoxia-inducible factor-1alpha is associated with angiogenesis, and expression of bFGF, PDGF-BB, and EGFR in invasive breast cancer. *Histopathology*, 46, 31-36.
421. Grimm,C., Wenzel,A., Groszer,M., Mayser,H., Seeliger,M., Samardzija,M., Bauer,C., Gassmann,M., and REme,C.E. (2002) HIF-1-induced erythropoietin in the hypoxic retina protects against light-induced retinal degeneration. *Nat.Med.*, 8, 718-724.
422. Kung,A.L., Wang,S., Klco,J.M., Kaelin,W.G., and Livingston,D.M. (2000) Suppression of tumor growth through disruption of hypoxia-inducible transcription. *Nat.Med.*, 6, 1335-1340.
423. Seagroves,T.N., Ryan,H.E., Lu,H., Wouters,B.G., Knapp,M., Thibault,P., Laderoute,K., and Johnson,R.S. (2001) Transcription factor HIF-1 is a necessary mediator of the pasteur effect in mammalian cells. *Mol.Cell Biol.*, 21, 3436-3444.
424. Semenza,G.L. (2001) Hypoxia-inducible factor 1: oxygen homeostasis and disease pathophysiology. *Trends Mol.Med.*, 7, 345-350.

425. Maxwell,P.H., Dachs,G.U., Gleadle,J.M., Nicholls,L.G., Harris,A.L., Stratford,I.J., Hankinson,O., Pugh,C.W., and Ratcliffe,P.J. (1997) Hypoxia-inducible factor-1 modulates gene expression in solid tumors and influences both angiogenesis and tumor growth. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 94, 8104-8109.
426. Millauer,B., Longhi,M.P., Plate,K.H., Shawver,L.K., Risau,W., Ullrich,A., and Strawn,L.M. (1996) Dominant-negative inhibition of Flk-1 suppresses the growth of many tumor types in vivo. *Cancer Res.*, 56, 1615-1620.
427. Plate,K.H., Breier,G., Weich,H.A., and Risau,W. (1992) Vascular endothelial growth factor is a potential tumour angiogenesis factor in human gliomas in vivo. *Nature*, 359, 845-848.
428. Plate,K.H., Breier,G., Millauer,B., Ullrich,A., and Risau,W. (1993) Up-regulation of vascular endothelial growth factor and its cognate receptors in a rat glioma model of tumor angiogenesis. *Cancer Res.*, 53, 5822-5827.
429. Chilov,D., Camenisch,G., Kvietikova,I., Ziegler,U., Gassmann,M., and Wenger,R.H. (1999) Induction and nuclear translocation of hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1): heterodimerization with ARNT is not necessary for nuclear accumulation of HIF-1alpha. *J.Cell Sci.*, 112 ( Pt 8), 1203-1212.
430. Richard,D.E., Berra,E., and Pouyssegur,J. (1999) Angiogenesis: how a tumor adapts to hypoxia. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 266, 718-722.
431. Tanimoto,K., Makino,Y., Pereira,T., and 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.
432. Kallio,P.J., Okamoto,K., O'Brien,S., Carrero,P., Makino,Y., Tanaka,H., and Poellinger,L. (1998) Signal transduction in hypoxic cells: inducible nuclear translocation and recruitment of the CBP/p300 coactivator by the hypoxia-inducible factor-1alpha. *EMBO J.*, 17, 6573-6586.
433. Hofer,T., Desbaillets,I., Hopfl,G., Gassmann,M., and Wenger,R.H. (2001) Dissecting hypoxia-dependent and hypoxia-independent steps in the HIF-1alpha activation cascade: implications for HIF-1alpha gene therapy. *FASEB J.*, 15, 2715-2717.
434. Liu,X.H., Kirschenbaum,A., Lu,M., Yao,S., Dosoretz,A., Holland,J.F., and Levine,A.C. (2002) Prostaglandin E2 induces hypoxia-inducible factor-1alpha stabilization and nuclear localization in a human prostate cancer cell line. *J.Biol.Chem.*, 277, 50081-50086.
435. Kallio,P.J., Wilson,W.J., O'Brien,S., Makino,Y., and Poellinger,L. (1999) Regulation of the hypoxia-inducible transcription factor 1alpha by the ubiquitin-proteasome pathway. *J.Biol.Chem.*, 274, 6519-6525.
436. Oikawa,T., Sasaki,T., Nakamura,M., Shimamura,M., Tanahashi,N., Omura,S., and Tanaka,K. (1998) The proteasome is involved in angiogenesis. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 246, 243-248.
437. Gao,N., Ding,M., Zheng,J.Z., Zhang,Z., Leonard,S.S., Liu,K.J., Shi,X., and Jiang,B.H. (2002) Vanadate-induced expression of hypoxia-inducible factor 1 alpha and vascular

- endothelial growth factor through phosphatidylinositol 3-kinase/Akt pathway and reactive oxygen species. *J.Biol.Chem.*, 277, 31963-31971.
438. Gao,N., Shen,L., Zhang,Z., Leonard,S.S., He,H., Zhang,X.G., Shi,X., and Jiang,B.H. (2004) Arsenite induces HIF-1alpha and VEGF through PI3K, Akt and reactive oxygen species in DU145 human prostate carcinoma cells. *Mol.Cell Biochem.*, 255, 33-45.
439. Khaleghpour,K., Li,Y., Banville,D., Yu,Z., and Shen,S.H. (2004) Involvement of the PI 3-kinase signaling pathway in progression of colon adenocarcinoma. *Carcinogenesis*, 25, 241-248.
440. Wang,Q., Wang,X., Hernandez,A., Kim,S., and Evers,B.M. (2001) Inhibition of the phosphatidylinositol 3-kinase pathway contributes to HT29 and Caco-2 intestinal cell differentiation. *Gastroenterology*, 120, 1381-1392.
441. Davidson,H.W. (1995) Wortmannin causes mistargeting of procathepsin D. evidence for the involvement of a phosphatidylinositol 3-kinase in vesicular transport to lysosomes. *J.Cell Biol.*, 130, 797-805.
442. Philpott,K.L., McCarthy,M.J., Klippel,A., and Rubin,L.L. (1997) Activated phosphatidylinositol 3-kinase and Akt kinase promote survival of superior cervical neurons. *J.Cell Biol.*, 139, 809-815.
443. Roche,S., Koegl,M., and Courtneidge,S.A. (1994) The phosphatidylinositol 3-kinase alpha is required for DNA synthesis induced by some, but not all, growth factors. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 91, 9185-9189.
444. Wang,Q., Wang,X., Hernandez,A., Hellmich,M.R., Gatalica,Z., and Evers,B.M. (2002) Regulation of TRAIL expression by the phosphatidylinositol 3-kinase/Akt/GSK-3 pathway in human colon cancer cells. *J.Biol.Chem.*, 277, 36602-36610.
445. Fang,J., Xia,C., Cao,Z., Zheng,J.Z., Reed,E., and Jiang,B.H. (2005) Apigenin inhibits VEGF and HIF-1 expression via PI3K/AKT/p70S6K1 and HDM2/p53 pathways. *FASEB J.*, 19, 342-353.
446. Jiang,B.H., Zheng,J.Z., Aoki,M., and Vogt,P.K. (2000) Phosphatidylinositol 3-kinase signaling mediates angiogenesis and expression of vascular endothelial growth factor in endothelial cells. *Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A*, 97, 1749-1753.
447. Arbiser,J.L. (2004) Molecular regulation of angiogenesis and tumorigenesis by signal transduction pathways: evidence of predictable and reproducible patterns of synergy in diverse neoplasms. *Semin.Cancer Biol.*, 14, 81-91.
448. Varet,J., Vincent,L., Mirshahi,P., Pille,J.V., Legrand,E., Opolon,P., Mishal,Z., Soria,J., Li,H., and Soria,C. (2003) Fenofibrate inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Cell Mol.Life Sci.*, 60, 810-819.
449. Zhong,X.S., Zheng,J.Z., Reed,E., and Jiang,B.H. (2004) SU5416 inhibited VEGF and HIF-1alpha expression through the PI3K/AKT/p70S6K1 signaling pathway. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 324, 471-480.

450. De Sarno,P., Li,X., and Jope,R.S. (2002) Regulation of Akt and glycogen synthase kinase-3 beta phosphorylation by sodium valproate and lithium. *Neuropharmacology*, 43, 1158-1164.
451. Mora,A., Sabio,G., Alonso,J.C., Soler,G., and Centeno,F. (2002) Different dependence of lithium and valproate on PI3K/PKB pathway. *Bipolar.Disord.*, 4, 195-200.
452. Wood,J.R., Nelson-Degrave,V.L., Jansen,E., McAllister,J.M., Mosselman,S., and Strauss,J.F., III (2005) Valproate-induced alterations in human theca cell gene expression: clues to the association between valproate use and metabolic side effects. *Physiol Genomics*, 20, 233-243.
453. Wachtershauser,A., Loitsch,S.M., and Stein,J. (2000) PPAR-gamma is selectively upregulated in Caco-2 cells by butyrate. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 272, 380-385.
454. Mueller,E., Sarraf,P., Tontonoz,P., Evans,R.M., Martin,K.J., Zhang,M., Fletcher,C., Singer,S., and Spiegelman,B.M. (1998) Terminal differentiation of human breast cancer through PPAR gamma. *Mol.Cell*, 1, 465-470.
455. Sarraf,P., Mueller,E., Jones,D., King,F.J., DeAngelo,D.J., Partridge,J.B., Holden,S.A., Chen,L.B., Singer,S., Fletcher,C., and Spiegelman,B.M. (1998) Differentiation and reversal of malignant changes in colon cancer through PPARgamma. *Nat.Med.*, 4, 1046-1052.
456. Tontonoz,P., Hu,E., and Spiegelman,B.M. (1994) Stimulation of adipogenesis in fibroblasts by PPAR gamma 2, a lipid-activated transcription factor. *Cell*, 79, 1147-1156.
457. Tontonoz,P., Nagy,L., Alvarez,J.G., Thomazy,V.A., and Evans,R.M. (1998) PPARgamma promotes monocyte/macrophage differentiation and uptake of oxidized LDL. *Cell*, 93, 241-252.
458. Panigrahy,D., Singer,S., Shen,L.Q., Butterfield,C.E., Freedman,D.A., Chen,E.J., Moses,M.A., Kilroy,S., Duensing,S., Fletcher,C., Fletcher,J.A., Hlatky,L., Hahnfeldt,P., Folkman,J., and Kaipainen,A. (2002) PPARgamma ligands inhibit primary tumor growth and metastasis by inhibiting angiogenesis. *J.Clin.Invest*, 110, 923-932.
459. Goetze,S., Eilers,F., Bungenstock,A., Kintscher,U., Stawowy,P., Blaschke,F., Graf,K., Law,R.E., Fleck,E., and Grafe,M. (2002) PPAR activators inhibit endothelial cell migration by targeting Akt. *Biochem.Biophys.Res.Commun.*, 293, 1431-1437.

## **EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG**

Ich erkläre: ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben 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 Fakultät ein Gesuch um Zulassung zur Promotion eingereicht, noch die vorliegende Arbeit als Dissertation vorgelegt.

Teile der vorliegenden Arbeit wurden in folgendem Publikationsorgan veröffentlicht:

Biochemical and Biophysical Research Communications 316 (2004) 693-697

Aschaffenburg im August 2005