

EINFLUSS DES
HISTONDEACETYLASE-INHIBITORS BELINOSTAT®
AUF DAS WACHSTUM VON
PANKREASTUMORZELLEN
IN VIVO UND IN VITRO

STEFANIE ARNOLD

INAUGURAL-DISSERTATION

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Aus dem Klinikum Veterinärmedizin
Klinik für Kleintiere
Klinische Pathophysiologie und klinische Laboratoriumsdiagnostik
Justus-Liebig-Universität Gießen
Betreuer: Prof. Dr. Andreas Moritz

und

der Klinik für Allgemein-, Viszeral- und Transplantationschirurgie
Universitätsklinikum Heidelberg
der Ruprecht-Karls-Universität Heidelberg
Betreuer: Prof. Dr. Jens Werner

EINFLUSS DES
HISTONDEACETYLASE-INHIBITORS BELINOSTAT®
AUF DAS WACHSTUM VON
PANKREASTUMORZELLEN
IN VIVO UND IN VITRO

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

Eingereicht von
Stefanie Arnold
Tierärztin aus Heidelberg

Gießen 2011

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

Dekan: Prof. Dr. Martin Kramer

Gutachter: Prof. Dr. Andreas Moritz

Prof. Dr. Jens Werner

Tag der Disputation: 15. Dezember 2011

Meinen Eltern & Jared

INHALTSVERZEICHNIS

1	EINLEITUNG	1
1.1	Das humane Pankreas: Anatomie und Physiologie	1
1.2	Das Pankreaskarzinom	2
1.2.1	Definition und Klassifikation	2
1.2.2	Epidemiologie	3
1.2.3	Ätiologie und Pathogenese	3
1.2.4	Diagnose	6
1.2.5	Therapie	6
1.3	Histonacetylierung und -deacetylierung	9
1.3.1	Epigenetik	9
1.3.2	Chromatin, Nukleosom und Histone	10
1.3.3	Mechanismen der Histondeacetylierung	11
1.3.4	Histondeacetylase-Inhibitoren	12
1.3.5	Histondeacetylase-Inhibitoren beim Pankreaskarzinom	14
1.3.6	Belinostat	16
1.4	Mausmodell	17
1.5	Aufgabenstellung	18
2	MATERIAL UND METHODEN	19
2.1	Material	19
2.1.1	Verbrauchsmaterialien	19
2.1.2	Chemikalien	20
2.1.3	Geräte und Software	21
2.1.3.1	Geräte	21
2.1.3.2	Zentrifugen	23
2.1.3.3	Mikroskope	23
2.1.3.4	Software	23
2.1.4	Medikamente	24
2.1.5	Antikörper und Proteine	24
2.1.6	Pufferlösungen	24
2.1.7	Zellmaterialien	26
2.2	Methoden	27
2.2.1	Zellkultur und Behandlung der Zellen	27
2.2.2	Bestimmung der Zellzahl	28
2.2.3	Bestimmung der Zellproliferation (MTT-Assay)	28
2.2.4	Bestimmung der Apoptoserate (Annexin V-Assay)	30
2.2.5	Immunologische Verfahren	32
2.2.5.1	Expression von H4 (Western Blot)	32
2.2.5.2	Expression von p21 (Western Blot)	33
2.2.6	Tierexperimentelle Studie	36

2.2.6.1	Versuchstiere	36
2.2.6.2	Injektionstechnik	36
2.2.6.3	Medikamente	37
2.2.6.4	Tierexperimentelles Studiendesign	37
2.2.7	Aktivität von KI-67 (Immunhistochemie)	38
2.2.8	Statistische Analysen	39
3	ERGEBNISSE	40
3.1	Zellproliferation	40
3.2	Apoptoserate	42
3.3	Expression von H4	49
3.4	Expression von p21	50
3.5	Einfluss von Belinostat auf das Tumorwachstum im Mausmodell	51
3.5.1	Tumorfläche der Mäuse mit subkutanen Tumoren	52
3.5.2	Tumorfläche der Mäuse mit Pankreastumor	53
3.5.3	Entwicklung der Mäusegewichte	53
3.6	Aktivität von KI-67	54
4	DISKUSSION	56
4.1	Einfluss von Belinostat auf die Proliferation von Pankreastumorzellen in vitro	57
4.2	Einfluss von Belinostat auf die Apoptoserate von Pankreastumorzellen	58
4.3	Einfluss von Belinostat auf die Histonacetylierung	59
4.4	Induktion von p21	60
4.5	Einfluss von Belinostat auf das Tumorwachstum in vivo	61
4.6	Nachweis der Proliferation in vivo durch Ki67	62
5	ZUSAMMENFASSUNG	64
6	SUMMARY	64
7	LITERATURVERZEICHNIS	66
8	TABELLENVERZEICHNIS	75
9	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	75
10	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	75

11	DANKSAGUNG	78
12	EHRENWÖRTLICHE ERKLÄRUNG	79

1 Einleitung

1.1 *Das humane Pankreas: Anatomie und Physiologie*

Die retroperitoneal liegende Bauchspeicheldrüse wird anatomisch in drei Abschnitte unterteilt: in den Kopf, der in der Biegung der Zwölffingerdarmschlinge liegt, in den Körper, der die Wirbelsäule und die Aorta in Höhe des ersten und zweiten Lendenwirbels überquert, und in den Schwanz, der bis zur Milz reicht.

Das Pankreas besteht aus einem exokrinen und einem endokrinen Drüsenanteil. Es ist 13 bis 18 cm lang, wiegt durchschnittlich 70 bis 110 g und liegt im oberen Bereich der Bauchhöhle (Schiebler 2004).

Als endokrine Drüse sezernieren die Langerhans-Inseln mehrere Hormone, wie Insulin, Glukagon, Somatostatin und das pankreatische Polypeptid. Ihre Aufgaben sind zum Beispiel die Steuerung des Kohlenhydratstoffwechsels oder die Hemmung von sekretorischen Vorgängen im Gastrointestinaltrakt.

Das exokrine Pankreas ist eine rein seröse Drüse, die pro Tag mehr als einen Liter Verdauungssaft produziert, der über das Pankreasgangsystem in den Zwölffingerdarm abgegeben wird. Er enthält verschiedene Verdauungsenzyme, die für die Aufschließung und Digestion der einzelnen Nahrungsbestandteile notwendig sind. Dazu gehören eiweißspaltende Enzyme (Proteasen, z.B. Trypsin), fettspaltende Enzyme (Esterasen, z.B. Lipase), kohlenhydratspaltende Enzyme (Carbohydrasen, z.B. Amylase) und nukleinsäurespaltende Enzyme (Nukleasen) (Schmidt 2002).

1.2 Das Pankreaskarzinom

1.2.1 Definition und Klassifikation

Das Pankreaskarzinom ist ein maligner, epithelialer, schnell wachsender Tumor der Bauchspeicheldrüse mit schlechter Prognose, der meistens vom Gangepithel ausgeht (Kästner 2004). Man unterscheidet exokrine und endokrine Tumore sowie Tumore des pankreatischen Bindegewebes. In der Gruppe der endokrinen Karzinome werden gut und schlecht differenzierte Tumore unterschieden, welche beide funktionell aktiv sein können. Gemischte endokrine und exokrine Karzinome kommen ebenso vor (DeLellis 2004). Darüber hinaus werden Pankreasmetastasen verschiedener Tumore abgegrenzt. Die häufigste Tumorform des Pankreas ist das duktales Adenokarzinom (Pancreatic ductal adenocarcinoma, PDAC), welches zu den exokrinen Tumoren gezählt wird (Löhr 2008).

Die Erkrankung ist charakterisiert durch ein ausgeprägtes lokal invasives Wachstum sowie eine frühzeitige lymphogene und hämatogene Metastasierungsfähigkeit (Warshaw and Fernandez-del Castillo 1992; Rothenberg, Abbruzzese et al. 1996; Wanebo and Vezeridis 1996). Zum Zeitpunkt der Diagnose weisen 80-90% der Patienten Metastasen auf, wobei die bevorzugten Metastasierungsorte die Leber (66%), die Lymphknoten (22%) und die Lunge (10%) sind (Löhr 2008). Im weiteren Verlauf kommt es zu einer Aussaat in direkt umliegendes Gewebe wie das Peritoneum, das Mesenterium oder das Omentum (Remmele 1997).

Anhand der Histomorphologie werden drei Karzinomtypen unterschieden (Löhr 2008):

1. Karzinome, die vom Pankreasgangepithel ausgehen

Zu dieser Gruppe zählen die tubulären Adenokarzinome, die etwa 85% aller Pankreaskarzinome ausmachen, zu 5-9% findet man pleomorphe duktales Karzinome und zu 1-3% duktales zystische Adenokarzinome. 70% der Adenokarzinome sind im Pankreaskopf, 20 % im Korpus und 10 % im Pankreasschwanz lokalisiert.

2. Karzinome, die vom Pankreasazinusepithel ausgehen

Azinäre Karzinome kommen bei weniger als 1% der Patienten vor.

3. Karzinome mit unklarer Histogenese

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

Die klinische Einteilung (TNM-Klassifikation) und Staging erfolgen nach der Internationalen Vereinigung gegen Krebs (UICC 2010). Hierbei unterscheidet man anhand des entsprechenden TNM-Status sieben Stadien, die eine Aussage darüber geben, inwieweit sich der Tumor von der Bauchspeicheldrüse ausgehend auf andere Bereiche des Körpers ausgebreitet hat (Krebsgesellschaft 2009). T beschreibt hierbei den Primärtumor und dessen Ausbreitung auf benachbarte Gewebe, N steht für die Mitbeteiligung regionaler Lymphknoten und M für Fernmetastasen.

1.2.2 Epidemiologie

In Deutschland wird die Zahl der jährlichen Neuerkrankungen bei Männern auf etwa 6.000, bei Frauen auf etwa 6.600 geschätzt. Pankreaskarzinome sind in Deutschland für 6,1 % aller Krebstodesfälle verantwortlich und sind die vierthäufigste Krebstodesursache bei Frauen und die fünfhäufigste bei Männern. Laut Deutschem Krebsregister liegt das mittlere Erkrankungsalter für Männer bei über 68, für Frauen bei etwa 76 Jahren (Krebsregister 2006). Bedingt durch die Aggressivität der Erkrankung und die Ineffektivität vieler Therapie- und Diagnoseansätze besteht nach wie vor eine schlechte Prognose. In den letzten Jahren konnte jedoch die mediane Überlebensrate von nur fünf Monaten (Hedberg, Borgstrom et al. 1998) auf 20 bis 24 Monate (Wagner, Redaelli et al. 2004), ebenso wie die 5-Jahres-Überlebensrate von 5% (Rothenberg, Abbruzzese et al. 1996; Landis, Murray et al. 1999) auf ca. 25% (Wagner, Redaelli et al. 2004; Jemal, Siegel et al. 2010) deutlich verbessert werden.

1.2.3 Ätiologie und Pathogenese

Neben der Risikoerhöhung durch Alter, Diabetes (Everhart and Wright 1995; Strickler, Wylie-Rosett et al. 2001) und chronischer Pankreatitis, ist Nikotinabusus der Hauptrisikofaktor für Bauchspeicheldrüsenkrebs (Gold and Goldin 1998; Silverman 2001; Raimondi, Maisonneuve et al. 2007).

Ein weiterer Risikofaktor ist die Ernährung. Vor allem beim Konsum von tierischen Proteinen und Fetten wurde ein erhöhtes Risiko festgestellt, wohingegen der Verzehr von Obst und Gemüse zu einer Erniedrigung des Risikos führen soll. Bei dieser Annahme ist zu beachten, dass die Interpretation der Daten schwierig ist, da Menschen mit hohem Obst- und

Gemüsekonsum statistisch gesehen gleichzeitig weniger Fleisch konsumieren und auch weniger rauchen.

Auch die Exposition mit Karzinogenen erhöht das Risiko an Pankreaskrebs zu erkranken. So wurde eine erhöhte Rate an Erkrankungen bei Chemikern (z. B. bei Exposition mit Acrylamid), bei Arbeitern, die Kohle und Gas ausgesetzt sind und bei Arbeitern der Metall-, Textil- und Lederindustrie und im Transportwesen festgestellt (Löhr 2008).

Auch hereditäre Formen des Pankreaskarzinoms sind beschrieben worden (Tersmette, Petersen et al. 2001)

Viele Gene unterliegen während Entwicklung und Fortschreiten des PDAC genetischen Veränderungen, was sich entweder als Aktivierung oder als Inaktivierung darstellen kann. Diese Gene haben unter anderem Einfluss auf Zellzykluskontrolle, Apoptose und Zellbeweglichkeit, Aktivierung von Onkogenen und Inhibierung von Tumorsuppressorgenen (Hahn and Schmiegel 1998; Kern 1998). Mehr als 75% aller Pankreaskarzinome besitzen mindestens drei genetische Alterationen zur gleichen Zeit, was eine Erklärung für die häufig beobachtete besondere Resistenz gegenüber Chemo- und Radiotherapie sein könnte (Lionetto, Pugliese et al. 1995; Clark, Glicksman et al. 1996).

Im Jahr 2000 stellten Hruban et al. (Hruban, Goggins et al. 2000) ein Modell zum molekularen Verlauf von Pankreaskrebs-Läsionen vor, das PanIN-Modell (**P**ancreatic **I**ntraepithelial **N**eoplasia-Model). Dieses Modell beschreibt die Entwicklung eines normalen Gangepitheliums im Pankreas zu einem infiltrierenden Pankreastumor (Abb. 1).

Hierbei transformiert das normale Pankreasepithel schrittweise über flache Epithelhyperplasien (PanIN-1A), papilläre Hyperplasien ohne oder mit Atypien (PanIN-1B beziehungsweise PanIN-2) zu einem Carcinoma in situ (PanIN-3), welches schließlich zu einem invasiven Karzinom entartet (Hruban, Adsay et al. 2001).

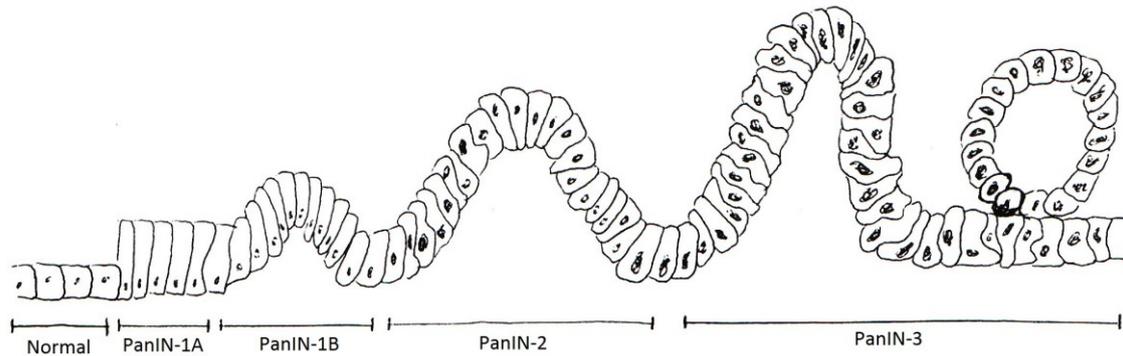


Abbildung 1: Entwicklungsmodell des Pankreaskarzinoms (modifiziert nach Hruban et al. 2000)

Die Entstehung maligner Tumorerkrankungen ist abhängig von Veränderungen zellulärer Signalkaskaden, die den apoptotischen Zelltod verhindern und dadurch eine Störung der Homeostase bewirken. Die abweichende oder fehlende Apoptoseregulation in Tumorzellen ist verantwortlich für die Therapieresistenz maligner Tumorerkrankungen, könnte aber gleichzeitig neue Therapieansätze ermöglichen. Beim Pankreaskarzinom kommt es durch Mutationen zu einer verstärkten Expression von Wachstumsfaktoren, die eine anti-apoptische Wirkung besitzen. Durch dieses Mutationsspektrum wird beim PDAC auf der einen Seite eine Fülle von onkogenen und mitogenen Stimuli geboten, auf der anderen Seite sind Zellzykluskontrolle und Apoptoseinduktion außer Kraft gesetzt. Das Zusammenspiel dieser Faktoren mag das aggressive Wachstumsverhalten und die schlechte Prognose dieses Tumors erklären (Westphal and Kalthoff 2003).

Das Überleben der Tumorzellen kann durch verschiedene Faktoren ermöglicht und gefördert werden:

- i. Umgehung der Apoptose beispielsweise durch Resistenz gegen Fas, einen Rezeptor der Tumor Nekrose Faktor (TNF)-Familie, und TRAIL, den TNF-verbundenen Apoptose-indizierenden Ligand,
- ii. Expression von Wachstumsfaktoren wie epidermal growth factor receptor (EGFR), transforming growth factor- α (TGF- α) und Insulin like growth factor (IGF),
- iii. kontinuierliche Angiogenese beispielsweise durch den vaskulären endothelialen Wachstumsfaktor (VEGF),
- iv. natürliche Unempfindlichkeit gegenüber Anti-Wachstumssignalen durch Mutation des Proteins Smad4 und des Tumorsuppressorgens INK4A.

Ihre Verbreitung sichern die Tumorzellen durch Gewebeinvasion und Metastasenbildung (Welsch, Kleeff et al. 2007).

1.2.4 Diagnose

Da die Symptome zu Beginn der Erkrankung meistens unspezifisch sind oder gänzlich fehlen, ist bei 90% der Patienten die Erkrankung bei Diagnosestellung schon sehr weit fortgeschritten und der Tumor hat bereits retroperitoneale Strukturen ergriffen und in regionale Lymphknoten, Leber oder Lunge metastasiert (Freelove and Walling 2006; Chari 2007).

Die häufigsten Beschwerden und Symptome sind Gewichtsverlust, abdominale Schmerzen, Gelbsucht und in selteneren Fällen Appetitverlust, Übelkeit und Diabetes mellitus (Howard and Jordan 1977).

Eine Verdachtsdiagnose auf ein Pankreaskarzinom kann nach Erhebung der Anamnese, klinischer Untersuchung und Labordiagnostik gestellt werden. Den nächsten Schritt stellt der transkutane Ultraschall dar. Trotz Störfaktoren wie Darmgasüberlagerungen oder Adipositas können auf diese Weise 70% der Karzinome diagnostiziert und zusätzlich Aussagen über die Fernmetastasierung gemacht werden. Einen guten Überblick sowie Erkennung von Metastasen bietet eine Computertomographie (Grenacher and Klauss 2009). Bei erkennbarem inoperablen Stadium bzw. bei dem Verdacht auf einen Tumor anderer histologischer Genese als das Adenokarzinom ist eine Feinnadelbiopsie vor Therapiebeginn indiziert, um eine palliative Therapie einzuleiten (Fritscher-Ravens, Izbicki et al. 2000). Ansonsten ist eine Biopsie präoperativ nicht anzuraten (Hartwig, Schneider et al. 2009).

1.2.5 Therapie

Die Therapie des Pankreaskarzinoms kann prinzipiell durch chirurgische Resektion, Radiotherapie, Chemotherapie oder eine Kombination aus diesen durchgeführt werden. Die chirurgische Resektion stellt aus onkologischer Sicht die bis dato einzige Möglichkeit mit kurativem Ansatz oder zumindest mit einer Lebenszeitverlängerung der Patienten dar (Warshaw and Fernandez-del Castillo 1992; Loos, Friess et al. 2009). Bis zum heutigen Zeitpunkt hat kein chemotherapeutisches Verfahren einen signifikanten Einfluss auf die Langzeitüberlebensraten der Pankreaskarzinompatienten (Stathis and Moore 2010).

Die Option des kurativen Ansatzes besteht nur für etwa 20% der Patienten. Je nach Lokalisation und Ausdehnung des Tumors stehen unterschiedliche Operationsverfahren zur Verfügung. In den letzten Jahren führten hohe Qualitätsstandards in der Chirurgie nach

kompletter Resektion zu einer mittleren Fünf-Jahres-Überlebensrate von durchschnittlich 20%, wobei zum Teil große Schwankungen in den Publikationen existieren (Gudjonsson 1987; Manabe and Tobe 1989; Birkmeyer, Sun et al. 2007).

Für die zu 60-70% im Pankreaskopf auftretenden Karzinome stellt die Pylorus-erhaltende Whipple-Operation (pp-Whipple) oder der klassische Kausch-Whipple (c-Whipple) die Standardoperation dar. Der klassische Whipple besteht aus der kompletten Entfernung des Pankreaskopfes, des Duodenums, der Gallenblase zusammen mit dem distalen Choledochus, der peripankreatischen Lymphknoten sowie der Lymphknoten im Bereich des hepatoduodenalen Ligaments und der distalen Hälfte des Magens (Künzli 2004). Die Komplikationsrate und die Mortalität sind von der Anzahl der durchgeführten chirurgischen Eingriffe („case load“) abhängig. Große Zentren mit entsprechender Erfahrung können den Eingriff mit einer postoperativen Mortalität von unter 5% durchführen (Birkmeyer, Siewers et al. 2002).

Das Primärziel des palliativen Ansatzes ist, die weitere Tumorprogression zu verhindern und eine Krankheitsstabilisierung zu erreichen (Glimelius, Hoffman et al. 1996).

Nach erfolgter Resektion und bei inoperablen Tumoren kommen Chemotherapeutika und Radiotherapie zum Einsatz. In der ESPAC-1-Studie (Neoptolemos, Stocken et al. 2004) konnte der Vorteil einer adjuvanten Chemotherapie mit 5-Fluorouracil gegenüber einer Strahlentherapie nachgewiesen werden, desgleichen zeigte sich eine signifikante Verbesserung der Überlebensrate mit dem Chemotherapeutikum Gemcitabine in der CONKO-001-Studie (Oettle, Post et al. 2007). Das Problem der Therapie ist die hochgradige Resistenz des Pankreaskarzinoms gegenüber vielen verwendeten Therapeutika (Gustin, Pederson et al. 2002) sowie die zahlreichen mit einer Hochdosis-Chemotherapie verbundenen Nebenwirkungen (Linskens, Golding et al. 2000; Haag and Ehninger 2002). Aufgrund unzureichender Spezifität der Radio- und Chemotherapien werden neben den erkrankten Zellen oftmals nicht maligne Zellen angegriffen, was teilweise erhebliche Nebenwirkungen zufolge hat. Zusätzlich werden häufig nicht alle Tumorzellen eliminiert. Diese sogenannten residuellen Tumorzellen führen dann zur Bildung von Metastasen oder Rezidiven und stellen den Hauptgrund für einen Krankheitsrückfall nach Standardtherapie dar (Haag and Ehninger 2002). Dies verdeutlicht, dass bei der Entwicklung von neuen Therapiestrategien der Fokus auf die spezifische Eliminierung jeder malignen Zelle gerichtet sein sollte.

Nachdem bis Ende der 90er Jahre hauptsächlich 5-Fluorouracil eingesetzt wurde (Schmoll, Buchele et al. 1999), stehen heute Protokolle mit Gemcitabine (Lilly 2004) im Vordergrund der Chemotherapie (Burriss, Moore et al. 1997; Brus and Saif 2010). Gemcitabine (Abb. 2) bewirkt die Hemmung der Ribonukleotidreduktasen und dadurch eine Hemmung der DNA-Synthese. Darüber hinaus dienen phosphorylierte Gemcitabine-Metaboliten als Baustein für die DNA, so dass ein regelgerechter Aufbau nicht mehr gewährleistet ist (Plunkett, Huang et al. 1995; Plunkett, Huang et al. 1995; Lilly 2004).

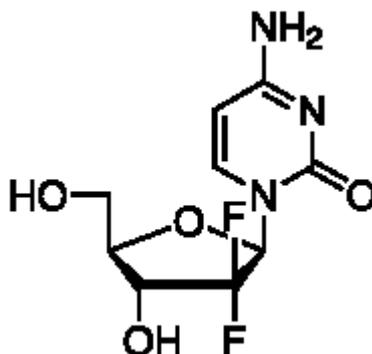


Abbildung 2: Strukturformel Gemcitabine (nach Produktinformation von Lilly, 2004)

Trotz relativ bescheidener Ansprechraten zeigt Gemcitabine einen guten Ansatz bei der Behandlung von Patienten in Bezug auf eine Stabilisierung des Krankheitsverlaufs, eine Reduktion der Symptome und eine längere Überlebenszeit (Burriss, Moore et al. 1997; Oettle, Post et al. 2007; Neoptolemos, Stocken et al. 2009; Neoptolemos, Stocken et al. 2010). Aufgrund des Wirkungsmechanismus, der geringen Toxizität und der therapeutischen Wirksamkeit wird Gemcitabine vor allen Dingen in neuen Kombinationstherapien mit anderen Antitumor-Mitteln und mit Strahlentherapie weiter erforscht (Oettle, Arnold et al. 2000; Heinemann 2001).

Der Nutzen einer neoadjuvanten und adjuvanten Radiotherapie ist aufgrund fehlender randomisierter Studien noch nicht beurteilbar. Ziel der aktuellen Forschung ist es, Kombinationen von Chemotherapeutika und Bestrahlung zu etablieren, die die Prognose beim Pankreaskarzinom verbessern und zu besseren Responseraten führen. Dazu werden zu oben genannten Behandlungsmethoden neue Therapien getestet und bereits eingesetzt. So wurden beispielsweise gezielte Krebstherapien (sogenannte "Targeted Therapy") entwickelt, welche sich speziell an die Verhältnisse der Tumorzelle anpassen, indem spezifische Antikörper dagegen gebildet werden. Aber auch Gentherapie, Hormontherapie, Endoskopische Therapie und weitere Verfahren werden inzwischen erprobt (Löhr 2008).

1.3 Histonacetylierung und -deacetylierung

1.3.1 Epigenetik

Der Begriff „Epigenetik“ bezeichnet diejenigen Mechanismen, die es Zellen ermöglichen ein von ihrer individuellen Funktion und Umgebung geprägtes Genexpressionsmuster zu etablieren und ohne Veränderung der DNA-Sequenz zu vererben. Die epigenetische Regulation stellt somit das Bindeglied zwischen den uniformen Erbanlagen eines Organismus und der Individualität der einzelnen Zellen dar (Kornberg and Lorch 1999; Esteller 2006).

Das Genom eukaryotischer Zellen liegt im Zellkern in geordneter Form als Chromatin, einem Komplex aus DNA und Proteinen, vor. Die epigenetische Regulation erfolgt durch chemische Veränderungen der Chromatinbestandteile, wie die posttranslationale Modifikation von Histon-Proteinen oder die Methylierung der DNA, und beeinflusst die Aktivität der betroffenen Abschnitte des Genoms. Im Gegensatz zu genetischen Mutationen, die zu Sequenzveränderungen der DNA führen, sind die auf biochemischen Modifikationen des Chromatins beruhenden Epimutationen reversibel (Reik 2007).

Zu den regulatorischen Modifikationen gehören die Acetylierung der Lysine, die Methylierung der Lysine und Arginine, die Phosphorylierung der Serine sowie die Ubiquitinierung und SUMOylierung der Lysine (Davie 1998; Strahl and Allis 2000; Gregory, Wagner et al. 2001; Jenuwein and Allis 2001).

Epigenetische Veränderungen spielen eine essentielle Rolle für die normale Funktionsweise eines Organismus von der Embryonalentwicklung bis zur Differenzierung spezialisierter Zelltypen. Obwohl der genaue Mechanismus der Regulation noch nicht vollständig aufgeklärt ist, konnte der Zusammenhang zwischen Veränderungen im epigenetischen Code und der Entartung von Zellen festgestellt werden. Derartige Veränderungen können zur Aktivierung von Onkogenen und zur Inaktivierung von Tumorsuppressor-Genen führen, die Einfluss auf die Regulation des Zellzyklus, der Apoptose und von DNA-Reparaturmechanismen haben. Diese Eigenschaft wird von epigenetischen Therapieansätzen genutzt, deren Ziel es ist, durch die Inhibierung bestimmter Chromatin-modifizierender Enzyme das Ungleichgewicht in der epigenetischen Regulation zu beheben (Reik 2007).

1.3.2 Chromatin, Nukleosom und Histone

Nukleosome sind die Untereinheiten des Chromatins, welches einen Komplex aus DNA und Proteinen darstellt (Abb. 3). Sie setzen sich aus einem Oktamer aus Paaren der Histone H4, H3, H2A und H2B zusammen, um das ein jeweils 146 Basenpaare umfassender DNA-Abschnitt gewunden ist. Jedes Nukleosom wird zusätzlich in einer Spiraltour von DNA-Basenpaaren (Linker-DNA) umschlungen, die benachbarte Nukleosomen miteinander verbindet. Zwischen den einzelnen Nukleosomen liegt außerdem jeweils ein H1 Histonprotein, das der gesamten Struktur Stabilität verleiht (Kornberg and Lorch 1999).

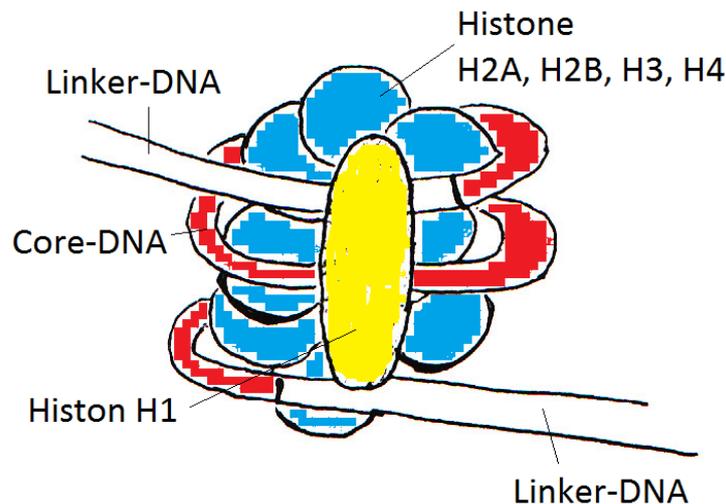


Abbildung 3: Struktur eines Nukleosoms: Histonoktamer aus den Histonen H2A, H2B, H3 und H4 und der core-DNA; Linker-DNA als Verbindung zum nächsten Nukleosom; H1 Histonprotein zur Stabilisierung (modifiziert nach Unterlagen der Uni Marburg, Vorlesung Chemische Biologie, 2008)

Das Nukleosom hat eine positive Gesamtladung und steht mit der DNA, die eine negative Gesamtladung besitzt, in enger elektrostatischer Wechselwirkung. Wird diese Wechselwirkung zwischen Nukleosom und DNA aufgehoben, ist die DNA frei für Transkriptionsfaktoren, Reparaturenzyme und DNA-Replikationsvorgänge. Eine Aufhebung der Wechselwirkung tritt durch eine Änderung des Ladungszustands des Nukleosoms ein wie beispielsweise Methylierung, Phosphorylierung, Acetylierung oder Deacetylierung (Mahlknecht 2002).

1.3.3 Mechanismen der Histondeacetylierung

Die bei weitem häufigsten und am besten charakterisierten posttranslationalen Veränderungen an Histonproteinen sind eine reversible Acetylierung bzw. Deacetylierung an spezifischen N-terminalen Lysinresten von Histonen. Das dynamische Gleichgewicht zwischen diesen beiden Reaktionen wird von zwei kompetitiven Enzymfamilien, den Histon-Acetyltransferasen (HAT) und den Histon-Deacetylasen (HDAC), reguliert.

Unter physiologischen Bedingungen weisen Histonden positiv geladene Lysinreste auf, welche aufgrund elektrostatischer Wechselwirkungen eine enge Bindung mit dem negativ geladenen Phosphatgerüst der DNA eingehen. Dies resultiert in einer kondensierten Chromatinstruktur, so dass keine Transkription stattfindet. Die Acetylierung von Histonproteinen durch Übertragung einer aktivierten Acetyl-Gruppe auf N-terminale Lysinreste wird durch HAT katalysiert. Diese posttranslationale Modifikation korreliert mit einer erhöhten transkriptionellen Aktivität, welche zu einem Umbau der Chromatinstruktur führt (Marmorstein and Roth 2001).

Der umgekehrte Vorgang, die Deacetylierung von N-terminalen Lysinresten, wird analog durch die antagonistischen Enzyme mit HDAC-Aktivität bewerkstelligt und führt über die Demaskierung der positiv geladenen Lysinreste zur Kondensation des Chromatins und zur transkriptionellen Repression von Zielgenen (Davie 1998).

1.3.4 Histondeacetylase-Inhibitoren

Als Histondeacetylase-Inhibitoren (HDACi) werden Substanzen bezeichnet, die in der Lage sind HDACs zu hemmen und somit eine Hyperacetylierung der Histone zu bewirken (Marks, Richon et al. 2004).

Entsprechend ihrer chemischen Struktur werden HDACi wie folgt unterteilt (Lindemann, Gabrielli et al. 2004; Marks, Richon et al. 2004):

- 1) Hydroxamsäuren: Trichostatin A (TSA), Suberoylanilide Hydroxamid Acid (SAHA), Vorinostat, PXD101 (Belinostat), CBHA, ABHA, NVP-LAQ824, Oxamflatin, Sciptaid, Pyroxamid
- 2) Zyklische Peptide: Trapoxin (TPX), Depsipeptid (FK228), Apicidin, CHAP (TSA-TPX-hybrid)
- 3) Kurzkettige und aromatische Fettsäuren: Valproinsäure (VPA), Natriumbutyrat, Natriumphenylbutyrat, Phenylacetat
- 4) Benzamide: MS-275, CI-994
- 5) Ketone: Trifluormethyl-Ketone, α -Ketoamide

Verschiedene cDNA microarray-Studien konnten zeigen, dass HDACi in Abhängigkeit von Substanz und Zelltyp in der Lage sind, selektiv die Expression von 2-25% aller Gene zu verändern (Van Lint, Emiliani et al. 1996; Glaser, Staver et al. 2003; Peart, Smyth et al. 2005).

Mehrere HDAC-Inhibitoren können das Tumorwachstum nachweislich *in vivo* hemmen. In den meisten Studien zeigten Butyratderivate gute Ergebnisse. Diese waren jedoch nur in relativ hohen Dosen wirksam. Andere HDAC-Inhibitoren wie zum Beispiel TSA oder SAHA inhibierten im Tierversuch Prostata-, Brust- oder Lungentumore mit nur geringer Toxizität (Marks, Rifkind et al. 2001; Vigushin, Ali et al. 2001).

Im Nagermodell konnte gezeigt werden, dass HDAC-Inhibitoren die Tumorprogression hemmen. Butyrat inhibierte das Wachstum von Kolon-, Prostata-, Endometriums- und Gebärmutterhalskrebs. Valproat verzögerte das Wachstum von primärem Brustkrebs und minimierte die Zahl an Metastasen in der Lunge. Hydroxamsäuren wie SAHA oder TSA hemmten weiterhin das Wachstum einiger solider Tumore. Die Einflüsse von HDACi führten *in vivo* zur Histonacetylierung und induzierten Tumorzelldifferenzierung oder Apoptose, abhängig vom Zelltyp, bei minimaler Toxizität (Marks, Rifkind et al. 2001; Johnstone 2002).

HDACi zeigen folgende biologische Effekte:

Apoptoseinduktion: Epigenetische Veränderungen durch HDACi führen in Tumorzellen durch Hoch- bzw. Herunterregulation der Expression Apoptose-regulierender Gene zu einer Senkung der Reizschwelle für apoptotische Signale. Moleküle der intrinsischen oder extrinsischen Apoptosekaskade sind hierbei wichtige Zielstrukturen fast aller bisher bekannten Substanzen mit HDACi-Wirkung (Johnstone and Licht 2003; Lindemann, Gabrielli et al. 2004). Diese Eigenschaft, maligne Zellen gegenüber dem programmierten Zelltod sensibilisieren zu können, macht HDACi zu geeigneten Kombinationspartnern, sowohl von konventionellen Chemotherapeutika, als auch von neuartigen Substanzen. Das therapeutische Potenzial der HDACi ist ihre Fähigkeit, selektiv Apoptose in Tumorzellen zu induzieren. Ausführliche Beweise für die Tumorselektivität liefern vorklinische Tiermodelle und klinische Studien, welche zeigen, dass HDACi starke Antitumorwirkungen bei minimal toxischen Dosen aufweisen (Kelly and Marks 2005).

Zellzyklusarrest: Es konnte gezeigt werden, dass Tumorzellen, die mit HDAC-Inhibitoren behandelt wurden, in der G1-Phase oder spätestens in der G2-Phase ihres Zellzyklus stehen bleiben. Die meisten Tumorzellen, die sich trotz Behandlung mit HDAC-Inhibitoren über die G1-Phase hinaus entwickeln, replizieren ihre DNA und gehen anschließend durch Apoptose zugrunde (Johnstone 2002; Mahlknecht 2002; Ottmann 2002).

Genexpression: Eines der Gene, welches durch HDACi induziert wird ist p21, ein Inhibitor zyklin-abhängiger Kinasen, welcher hemmend oder aktivierend in den Zellzyklus eingreift. Dies kann entweder abhängig oder unabhängig von dem Tumorsuppressor p53 geschehen. Die Aktivierung von p21 geht mit der Acetylierung von H3 und H4, der Methylierung verschiedener Histonbereiche und Veränderungen von Multiproteinkomplexen, welche die p21 Transkription regulieren, einher (Richon, Sandhoff et al. 2000; Liu, Chan et al. 2008).

Resistenz: Die HDAC-Inhibitoren lösen in tumoralen Geweben Zellzyklusarrest aus und induzieren Apoptose oder Differenzierung tumoraler Zellen (Marks, Richon et al. 2000; Bhalla 2005). Normale Zellen dagegen sind kaum von diesen Auswirkungen betroffen, was einen enormen Vorteil für potentielle Chemotherapeutika darstellt. Tumorzellen weisen zahlreiche Defekte in Proteinen zur Regulation von Zellproliferation, Überleben bzw. Zelltod und Migration auf, so dass sie weniger fähig sind, die Effekte von HDACi zu kompensieren

(Dokmanovic, Clarke et al. 2007). Tumorzellen zeigen im Vergleich zu gesunden Zellen zehnmal so viel Sensitivität gegenüber HDACi, was den direkten Beweis für die HDACi vermittelte selektive Tumorzellvernichtung darstellt (Dokmanovic and Marks 2005).

Tumorangiogenese, Metastasierung und Invasion: HDACi zeigen anti-angiogenese und anti-invasive Aktivität in vivo und in vitro, welche zur Hemmung der Tumorentwicklung und –progression beisteuern (Bolden, Peart et al. 2006). Durch die Suppression von Angiogenesefaktoren wird die Neubildung von Blutgefäßen verhindert, so dass es zu keiner weiteren Tumorentwicklung kommen kann (Kim, Kwon et al. 2001).

Immunmodulatorische Effekte: HDACi sind in der Lage Antitumorimmunität durch verschiedene Mechanismen zu verändern. Zu diesen Möglichkeiten gehören unter anderem die Hochregulierung von Tumorantigenen, die Förderung der zellulären Immunerkennung und die Lyse von Tumorgewebe durch T-Zellen und natürliche Killerzellen und die Veränderung von T-Zellen sowie von Zytokinen (Bolden, Peart et al. 2006; Schrump 2009). Zusätzlich zu diesen Aktivitäten, die das Tumorzellwachstum unmittelbar inhibieren, wurden weitere indirekte Effekte, wie z.B. die Aktivierung der Immunantwort durch Steigerung der Immunogenität des Tumors entdeckt (Maeda, Towatari et al. 2000; Magner, Kazim et al. 2000; Armeanu, Pathil et al. 2005).

Kombination mit anderen Medikamenten und Therapieformen: HDACi weisen zwar als Monotherapieansatz bereits klinische Erfolge auf, es ist aber anzunehmen, dass der klinische Nutzen wesentlich größer ist, wenn die Substanzen mit weiteren Chemotherapeutika bzw. mit Strahlentherapie kombiniert werden (Bolden, Peart et al. 2006).

1.3.5 Histondeacetylase-Inhibitoren beim Pankreaskarzinom

In mehreren Studien wurde bereits die Wirkung verschiedener HDACi auf das PDAC sowohl in vitro als auch in vivo getestet. In Pankreaskarzinomzellen rief TSA dosisabhängig eine erhöhte Expression von H4 und p21 hervor und verhinderte die DNA-Synthese (Emonds, Fitzner et al. 2010). Darüber hinaus wurden sowohl Wachstumshemmung als auch Apoptoseinduktion bei Behandlung mit TSA nachgewiesen. Ursachen hierfür waren unter anderem die erhöhte Induktion von verschiedenen Caspasen und p21 (Garcia-Morales, Gomez-Martinez et al. 2005). Donadelli und Kollegen zeigten, dass die Expression von p21

nach Behandlung mit TSA über den p53-unabhängigen Weg erfolgt. In diesem Experiment wurde das Wachstum der Pankreastumorzellen durch Zellzyklusarrest und Apoptose gehemmt (Donadelli, Costanzo et al. 2003; Moore, Barbi et al. 2004; Donadelli, Costanzo et al. 2007).

Durch SAHA wurden in sechs verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien sowohl Apoptose als auch Zellzyklusarrest und Differenzierung ausgelöst. Darüber hinaus wurde das Zellwachstum dosisabhängig gehemmt und die Expression von p21 erhöht (Garcia-Morales, Gomez-Martinez et al. 2005; Kumagai, Wakimoto et al. 2007). Auch Chen und Kollegen beobachteten eine gute antiproliferative Aktivität von SAHA in allen im Versuch verwendeten Zelllinien (Chen, Lopez-Sanchez et al. 2008). Zusätzlich zu den bereits genannten Veränderungen stieg auch die Acetylierung des Histons H3 (Arnold, Arkus et al. 2007).

Auf Grund der molekularen und biologischen Wirkungen sowie der geringen Toxizität gegenüber normalen Zellen ermöglichen HDACis schon als Monotherapie eine gute Tumorbehandlung, ihre Wirkung kann jedoch in Kombination mit anderen Medikamenten noch verstärkt werden. Vorinostat, ein HDACi, der bereits von der Food and Drug Assosiation (FDA) in den USA als Medikament zugelassen worden ist, wurde im PDAC in Kombination mit Sorafenib, einem Multikinaseinhibitor, untersucht. Bei der Behandlung mit beiden Medikamenten gemeinsam konnte ein synergistischer Effekt auf die Erhöhung des Zelltods festgestellt werden (Martin, Park et al. 2009).

In mehreren Studien konnten synergistische Effekte von Gemcitabine und TSA nachgewiesen werden. Dies wurde insbesondere an der Hemmung des Zellzyklusses und der DNA-Synthese sowie der Induktion der Apoptose deutlich (Piacentini, Donadelli et al. 2006; Donadelli, Costanzo et al. 2007; Gahr, Ocker et al. 2007). Die synergistische Hemmung zeigte sich ebenso in vivo: Mäusetumore sind bei der Kombinationsbehandlung von Gemcitabine und TSA um 50% kleiner als die unbehandelte Kontrollgruppe, ohne ein Anzeichen von Toxizität aufzuweisen (Donadelli, Costanzo et al. 2007). Bei einer Kombinationsbehandlung mit Gemcitabine und 4-Phenylbutyrat wurde in verschiedenen PDAC-Zelllinien ein additiver Effekt auf die Apoptoseinduktion festgestellt (Ammerpohl, Trauzold et al. 2007).

1.3.6 Belinostat

Belinostat, chemischer Name N-hydroxy-3-(phenylsulfanylphenyl)-Acrylamid, ist ein neuer HDAC-Inhibitor der Klasse Hydroxamsäuren mit einer breiten Antitumorwirkung (Abb. 4). Belinostat hat ein Molekulargewicht von 318g und inhibiert HDAC der Klassen I und II (Khan, Jeffers et al. 2008).

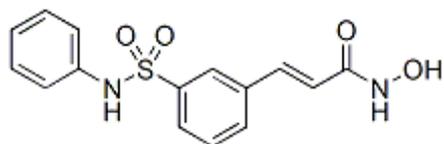


Abbildung 4: Strukturformel Belinostat (nach Produktinformation von TopoTarget, 2009)

Belinostat verändert die Expression wichtiger Tumor-assoziiierter Gene (Grozinger and Schreiber 2002). Unter anderem werden Enzyme, welche für die DNA-Synthese von Bedeutung sind, hoch reguliert (Tumber, Collins et al. 2007). Zellproliferation, Differenzierung, Zellbeweglichkeit und Überleben werden *in vitro* ebenfalls durch Belinostat verändert (Qian, LaRochelle et al. 2006). Der zyklinabhängige Kinaseinhibitor p21, welcher den Zellzyklus beeinflusst, wird dagegen herunter reguliert (Plumb, Finn et al. 2003). Daten aus diesen Studien belegen die Wirksamkeit von Belinostat sowohl als Monotherapie als auch in Kombination mit anderen Antitumormedikamenten wie 5-Fluorouracil (Tumber, Collins et al. 2007). Dank seiner geringen Toxizität und einer Wirkung bereits in geringen Dosen kann Belinostat als einer der wenigen HDACi nicht nur oral sondern auch intravenös, hier sogar als Dauertropfinfusion, verabreicht werden (TopoTarget 2009).

Sowohl *in vitro* als auch im Mausmodell zeigten sich positive Effekte von Belinostat in Bezug auf Zellzyklusarrest, Apoptoseinduktion und Differenzierung. Getestet wurden verschiedene solide Tumore wie Hepatozellularkarzinom (Ma, Sung et al. 2008), Mantelzelllymphom (Paoluzzi, Scotto et al. 2010), Blasenkarzinom (Buckley, Yoon et al. 2007), Kolorektalkarzinom (Tumber, Collins et al. 2007), Prostatakarzinom (Qian, Ara et al. 2008), Ovarkarzinom (Plumb, Finn et al. 2003; Qian, LaRochelle et al. 2006) und Plattenepithelkarzinom (Duan, Friedman et al. 2007), aber auch Zellen hämatologischer Neoplasien wurden untersucht (Stapnes, Rynningen et al. 2007; Dai, Chen et al. 2008).

Belinostat wird bereits erfolgreich in verschiedenen klinischen Studien der Phasen I und II getestet (Gimsing, Hansen et al. 2008; Mackay, Hirte et al. 2008; Steele, Plumb et al. 2008; Lassen, Molife et al. 2010; Steele, Plumb et al. 2010).

Da bisher für das Pankreaskarzinom keine Ergebnisse zur Therapie mit Belinostat vorliegen, ist dies ein interessanter Ansatz, einen weiteren soliden Tumor mit sehr schlechter Prognose zu therapieren.

Die verwendete Substanz wurde freundlicherweise von der Firma TopoTarget in Dänemark zur Verfügung gestellt.

1.4 Mausmodell

Die Möglichkeit, das Genom der Maus gezielt zu manipulieren, hat die Maus zu einem der wichtigsten genetischen Modellorganismen für den Menschen gemacht (Resor, Bowen et al. 2001). Neben der Anwendung bei metabolischen und neurodegenerativen Krankheiten sowie bei Fragestellungen in der Immunologie und bei Infektionserkrankungen wurden insbesondere im Bereich der Onkologie zahlreiche Mausmodelle entwickelt, die wesentlich dazu beigetragen haben, molekulare und biochemische Grundlagen der menschlichen Krankheiten zu verstehen und moderne Therapieformen zu erforschen (Wu and Pandolfi 2001). Hintergrund dieser Modelle ist die bemerkenswerte Homologie zwischen Maus und Mensch sowohl auf anatomischer und physiologischer als auch auf pathologischer Ebene. In der Tumorgenese zeigen sich erstaunliche Übereinstimmungen zwischen beiden Organismen bezüglich der beteiligten Tumorsuppressorgene und Onkogene sowie der Pathologie der jeweiligen Tumoren (Balmain and Harris 2000).

Die in diesem Versuch verwendeten Mäuse haben genetisch bedingt keinen Thymus. Dadurch können sie keine T-Zellen bilden und sind immundefizient. Aus diesem Grund können humane PDAC-Zellen in den Mäusen wachsen. Ihre ebenfalls angeborene Haarlosigkeit führt zur guten Sichtbarkeit von subkutanen Tumoren (River 2009).

Wegen des defekten Immunsystems müssen athymische Nacktmäuse in besonders steriler Umgebung gehalten werden. Die verantwortlichen Personen sollten Schutzkleidung wie Kittel, Hand- und Überschuhe, Mundschutz und Haube tragen. Mitgeführte Gegenstände sollten vorher desinfiziert werden, um ein Infektionsrisiko möglichst gering zu halten. In speziellen Räumen mit Luftfiltration werden die Mäuse in Filtertopkäfgen gehalten. Diese haben einen Käfigdeckel mit besonderer Oberfläche, so dass das Eindringen pathogener Keime weitestgehend verhindert wird.

1.5 Aufgabenstellung

Die Beeinflussung der epigenetischen Genregulation durch die neue Medikamentenklasse der Histondeacetylase-Inhibitoren (HDACi) ist ein interessanter und vielversprechender Ansatz in der zielgerichteten Tumorthherapie. Es ist anzunehmen, dass die Hemmung der Histondeacetylase und damit Hyperacetylierung der Histone eine Korrektur der epigenetischen Veränderungen möglich macht, was zur Normalisierung der gestörten Zelldifferenzierungs-, Zellproliferations- und Zelltodmechanismen maligner Zellen führt.

In kürzlich erschienenen Publikationen wurde gezeigt, dass verschiedene HDACi zur deutlichen Unterdrückung des Wachstums von Tumorzellen *in vitro* und *in vivo* führen können. Solche Effekte wurden bei verschiedenen hämatologischen und soliden Tumoren nachgewiesen. Dabei konnte auch eine additive, antitumoröse Wirkung dieser Wirkstoffe zusammen mit Chemotherapeutika gezeigt werden (Bolden, Peart et al. 2006).

Der Einfluss von HDACi auf das Pankreaskarzinom wurde bisher nur in geringem Ausmaß untersucht. Deshalb soll Belinostat, eine neue Substanz der HDACi-Reihe, sowohl *in vivo* als auch *in vitro* untersucht werden. Belinostat besitzt eine besonders starke Potenz der Blockierung der Histondeacetylase und wird bereits in klinischen Phase I und II Studien getestet (Gimsing, Hansen et al. 2008; Steele, Plumb et al. 2008).

In dieser Arbeit wird die Wirkung von Belinostat auf das Pankreaskarzinom sowohl *in vitro* als auch *in vivo* untersucht. Hierzu werden bei den Zelllinien T3M4, Panc-1 und ASPC und im Tiermodell Belinostat, das Chemotherapeutikum Gemcitabine sowie eine Kombination aus beiden Therapeutika getestet.

Hierzu wurden folgende Experimente durchgeführt:

- Bestimmung der Zellproliferation *in vitro* und *in vivo*
- Bestimmung der Apoptoserate
- Bestimmung des Effekts auf die Histonacetylierung
- Bestimmung der Expression von p21
- Bestimmung der Wachstumsrate der Tumoren bei athymischen Nacktmäusen

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Verbrauchsmaterialien

Cell Scraper BD [®]	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Chromatography Paper	Whatman, Maidstone, England
Deckgläser	Marienfeld, Lauda-Königshofen, Deutschland
Eppendorf [®] 1,5ml Tubes	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Falcon [®] Röhrchen 15ml pp-test tubes	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Falcon [®] Röhrchen 50ml pp-test tubes	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Filter Cards	Thermo, Burgwedel, Deutschland
Gel Blotting Papier	Schleicher & Schuell, Dassel, Deutschland
Kanülen 20G, 23G und 27G	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Kunststoffpipetten Costar [®] 2, 5, 25 ml	Corning Inc., Corning, NY, US
Kunststoffpipetten Cellstar [®] 10ml	Greiner, bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Mikro-Schraubröhre 1,5ml, PP	Sarstedt, Nümbrecht, Deutschland
Multi-Lochplatten 6-, 24-, 96-well	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
Nitrocellulose-Transfermembran	Bio-Rad, München, Deutschland
Objektträger	Menzel, Braunschweig, Deutschland
Parafilm [®]	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, USA
Pipettenspitzen (10, 20, 100, 200, 1000 µl)	Barrier Tips, Neptune, San Diego, USA
Prolene Fäden 5-0	Ethicon, New Jersey, USA
Q vials Gefriergeräte	Beckman Coulter, Fullerton, USA
Rundbodenröhrchen 5 ml	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Skalpell	Feather, Fukushima, Japan
Spritzen 1, 2, 5, 10 ml	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Spritzenfilter 0,2 µm	Nalgene, Rochester, NY, USA
Wägebapier	Neolab, Heidelberg, Deutschland
Wattestäbchen	NOBA, Wetter, Deutschland
Western-Blot Film Hyperfilm [®]	Amersham, Buckinghamshire, UK
Zellkulturflaschen, 75cm ³	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Zellkulturschale (20mm)	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland

2.1.2 Chemikalien

Als Zellkulturmedium wurde, soweit nicht explizit anders erwähnt, RPMI 1640 Medium mit 10% fötalem Kälberserum und 1% Penicillin-Streptomycin verwendet.

Acrylamid-Bis	Serva, Heidelberg, Deutschland
L-Arginin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Aqua ad iniectabilia B	Braun, Melsungen, Deutschland
Bis/Tris Gele (4-12%)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
BCA Proteinbestimmungs-Kit	Pierce Chemical Co., Rockford, IL, USA
Bovines Serum Albumin (BSA)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
CHAPS	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Sigma, München, Deutschland
Dinatriumhydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
DMEM Dulbecco´s Modified Eagle Medium 1x	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
DTT	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
ECL [®] detection reagent	Amersham Biosciences, Freiburg, Deutschland
Essigsäure	Merck Biosciences, Schwalbach, Deutschland
Ethanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Etho 100%, 70%	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Fetales Kälberserum (FCS)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Flüssiger Stickstoff	TMG Sol Group, Gersthofen, Deutschland
F-12 Nutrient Mixture (Ham)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Formaldehyd Lösung 5%	Fischar, Saarbrücken, Deutschland
Glycerol	Merck Biosciences, Schwalbach, Deutschland
Glycin	Roche diagnostics, Mannheim, Deutschland
Hämatoxilin	Merck, Darmstadt, Deutschland
Isopropanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Kaliumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Kaliumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Liquid DAB + Substrate Chromogen System	DAKO, Kopenhagen, Dänemark
β-Mercaptoethanol	Sigma, München, Deutschland
Methanol	Roth, Karlsruhe, Deutschland

Material und Methoden

MINI-EDTA Complete Mini	Roche Diagnostics, Mannheim, Deutschland
MTT Thiazolyl Blue Tetrazolium Bromide	Sigma, München, Deutschland
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natriumdihydrogenphosphat	Merck, Darmstadt, Deutschland
Natronlauge	Merck, Darmstadt, Deutschland
Nonidet P 40 Substitute	Flucka, Buchs, Schweiz
Penicillin-Streptomycin	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Ponceau S	Fluka, Buchs, Schweiz
RNA Later	Ambion, FosterCity, USA
Roswell Park Memorial Institute (RPMI) 1640 Medium	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Roticlear	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Salzsäure (5 M)	Merck Biosciences, Schwalbach, Deutschland
Simplyblue™ Safestain	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
SlimFast®	Allpharm Vertriebs-GmbH, Messel, Germany
Sodiumdodecylsulfat (SDS)	Roth, Karlsruhe, Deutschland
TEMED	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Toluidinblau	Merck Biosciences, Schwalbach, Deutschland
Trans-Blot® Transfer-Medium	Bio-Rad, München, Deutschland
Tris Base	Merck Biosciences, Schwalbach, Deutschland
Trypanblau-Lösung	Sigma, Taufkirchen, Deutschland
0.25% Trypsin/EDTA	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Tween-20	Merck, Darmstadt, Deutschland
Wasserstoffperoxid	Roth, Karlsruhe, Deutschland

2.1.3 Geräte und Software

2.1.3.1 Geräte

Analysewaage Mettler AM 100	Mettler Toledo, Gießen, Deutschland
Autoklav Vakulab	HP Medizin Mechanik GmbH, München, Deutschland
CO ₂ -Inkubator	Sanyo Scientific, Bensenville, IL, USA
Cytospin 4	Thermo Shandon, Burgwedel, Deutschland

Material und Methoden

Eismaschine Scotsman	Kälte- und Klimatechnik ZUGCK, Leimen, Deutschland
Elektrische Pipette Pipetus Akku	Hirschmann, Eberstadt, Deutschland
Durchflusszytometer BD™ LSRII	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Gefrierschrank Liebherr Comfort	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Gefrierschrank Sanyo ultra low	MS Laborgeräte Schroeder, Wiesloch, Deutschland
Gelgießapparatur	Bio-Rad, München, Deutschland
Kühlschrank	Liebherr, Ochsenhausen, Deutschland
Magnetrührer Ika-Combimag RET	Jahnke & Kunkel, Staufen i. B., Deutschland
Microplatten ELISA-Lesegerät	Thermo Electron GmbH, Karlsruhe, Deutschland
Mini Protean® Tetra System	Bio-Rad, München, Deutschland
Neubauer-Zählkammer	Assistant, Sondheim, Deutschland
PH-Meter, Ø32	Beckman Coulter, Fullerton, USA
Pipetman® (1000µl, 200µl, 20µl, 10µl)	Gilson, Bad Camberg, Deutschland
Röntgenfilmkassette	Eastman, Kodak Company, Rochester, NY, USA
Röntgenfilmentwicklermaschine	Protec, Oberstenfeld, Deutschland
Semi Dry Blotter	Biometra, Göttingen, Deutschland
Stickstoffgefrierschrank Thermoform	Thermo Elektro, Dreieich, Deutschland
Sterilarbeitsbank Biowizard	Kojair, Uilppula, Finnland
Taumelrollenmischer CAT RM5,	Ingenieurbüro M. Zipperer GmbH, Staufen, Deutschland
Thermomixer	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Thermostatschrank Lic	Lovibond, Dortmund, Deutschland
Vortex Mixer REAX Top	Heidolph, Schwabach, Deutschland
Wärmebad	Lauda, Groton, CT, USA
Wasseraufbereitung Biocell A10	Millipore, Schwalbach/Ts, Deutschland
Wasserbad Thermolab	Thermo Electron, Dreieich, Deutschland
WB Entwicklermaschine	Vilber Lourmet, Eberhardzell, Deutschland
Western-Blot-Film Hyperfilm®	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
X-cell® Elektrophoresesystem	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

2.1.3.2 Zentrifugen

Centrifuge 5810R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland
Thermo IEC, 5697 Multi RF centrifuge	Thermo Electron, Dreieich, Deutschland
Tischzentrifuge 5415R	Eppendorf, Hamburg, Deutschland

2.1.3.3 Mikroskope

Konfokales Laserscanmikroskop TCS-SP	Leica, Bensheim, Deutschland
Lichtmikroskop	Leica, Bensheim, Deutschland

2.1.3.4 Software

Software für FACS-Analyse (Diva [®] mit CSD-Modul)	BD Bioscience, Heidelberg, Deutschland
GraphPad Prism 5.0	GraphPad Software Inc., La Jolla, CA, USA
ImageJ	NIH, Bethesda, MA, USA
Microsoft Word 2002	Mircosoft Corporation, Redmond, USA
Photoshop Adobe CS3	Adobe Systems Inc., San Jose, CA, USA
Ascent Software [®]	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, MA, USA
Fluostar Optima	BMG Labtech, Cary, USA
ChemiCapt, FusionCapt	Vilber, Eberhardzell, Deutschland

2.1.4 Medikamente

Belinostat	TopoTarget, Kopenhagen, Dänemark
Gemcitabine	Synchem, Felsberg Altenburg, Deutschland
Ketamin, Ketavet® 100mg/ml	Pfizer, Berlin, Deutschland
Natriumchloridlösung, isoton , 0,9%	Braun, Melsungen, Deutschland
Xylazin, Rapinovel® 2%	Bayer, Leverkusen, Deutschland

2.1.5 Antikörper und Proteine

Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Anti-p21 (WAF1/Cip1) (rabbit polyclonal)	Abcam, Cambridge, UK
Anti-rabbit IgG peroxidase linked	GE Healthcare Limited, Buckinghamshire, UK
Anti-GAPDH (14C10) (rabbit monoklonal)	CellSignaling, Danvers, USA
Page Ruler Prestained Protein Ladder	Fermentas Life Science, St. Leon-Rot, Deutschland
Bench Marker Prestained Protein Ladder	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
anti H4 acetyl, CHIP-Grade	Upstate Biotechnology, Billerica, USA
donkey anti-rabbit, POD konjugated	Promega, Mannheim, Deutschland
Mouse-anti human KI- 67	DAKO, Kopenhagen, Dänemark
Mouse IgG	Serotec, Düsseldorf, Deutschland
anti-actin (Clone AC-15)	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
goat anti-mouse	Dianova, Hamburg, Deutschland

2.1.6 Pufferlösungen

Dulbecco's Phosphat gepufferte Salzlösung (PBS) pH 7,4	PromoCell, Heidelberg, Deutschland
FACS Perm Puffer	BD Biosciences, Heidelberg, Deutschland
Laemmli Sample Buffer	Bio-Rad, München, Deutschland
NuPAGE® MOPS SDS Running Buffer	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
NuPAGE® Transfer Buffer (20x)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Restore™ Western Blot Stripping Buffer	Thermo, Rockford, USA

Material und Methoden

RIPA (Lysepuffer zur Proteinextraktion für p21)

H ₂ O	40 ml
Tris	0,303 g
NaCl	0,438 g
Nonidet P40 Substitute	500 µl
CHAPS	0,25 g
SDS	0,05 g
pH 8.0	mit 5 M HCl
H ₂ O	ad 50 ml

Zur Herstellung des Proteinlysates wurden 5 ml RIPA-Puffer mit einer Tablette MINI-EDTA Complete versetzt.

SDS Puffer (Lysepuffer zur Proteinextraktion für Histon 4)

Tris	12,4 ml
SDS	2g
Glycerin	11,5 ml
H ₂ O	ad 100 ml
DTT	1µl pro ml Puffer

TBS (10x Tris gepufferte Salzlösung)

Tris Base	12,1 g
NaCl	85 g
H ₂ O	800 ml
pH 7.4	mit 5 M HCl
H ₂ O	ad1000 ml

TBS-T (Wasch-Puffer)

10x TBS	100 ml
H ₂ O	ad 1000 ml
Tween-20	0,5 ml

Block-Puffer

TBST	10 ml
Slimfast®-Pulver	0,5 g

Citrat Puffer (200mM Stock-Lösung)

Citric acid	42g
H ₂ O	800 ml
pH 6.0	mit 5M HCl
H ₂ O	ad 1000 ml

Zur Herstellung eines 10mM Citrat Puffers werden 75 ml der Stock-Lösung mit 1425ml Millipore® Wasser gemischt

Trenngel

Acrylamide-Bis	5,67 ml
Trenngelpuffer (1,5M Tris/ Cl pH 8,8)	3,75 ml
Millipore® Wasser	5,43 ml
20% SDS	75 µl
10% Ammoniumpersulfat	150 µl
TEMED	6 µl

Sammelgel

Acrylamide-Bis	375 µl
Sammelgelpuffer (0,5M Tris/ Cl pH 6,8)	1,2 ml
Millipore® Wasser	2,74 ml
20% SDS	25 µl
10% Ammoniumpersulfat	150 µl
TEMED	6 µl

2.1.7 Zellmaterialien

Humane Pankreaskarzinom-Zelllinien

T3M4, ASPC, Panc-1

ATCC, Rockville, MD, USA

2.2 Methoden

2.2.1 Zellkultur und Behandlung der Zellen

Für die Untersuchungen wurden die humanen Pankreaskarzinomzelllinien T3M4 (in vitro und in vivo), Panc-1 (in vitro) und ASPC (in vitro) verwendet. Die Zelllinien stammten von der American Type Culture Collection.

Als Kulturmedium diente RPMI-1640 mit 10% fötalem Kälberserum und 1% Penicillin-Streptomycin. Die Zellen wurden unter sterilen Bedingungen im Inkubator bei 37°C und 5 % CO₂ in 75 cm³ Kulturflaschen gehalten. Alle zwei Tage fand an einer speziellen Arbeitsbank ein Mediumwechsel statt. Vor jedem Mediumwechsel wurden die Zellen lichtmikroskopisch auf Entwicklung und eventuelle bakterielle und/oder mykologische Kontamination kontrolliert.

Bei etwa 90% Konfluenz wurden die Zellen subkultiviert. Dazu wurde das alte Medium abgesaugt, die Zellen mit 10 ml PBS gewaschen und mit 2 (T3M4, Panc-1) bzw. 5 (ASPC) ml 0,2% Trypsin/ EDTA-Lösung bei 37°C überlagert. Trypsin ist eine Protease, die Proteine an Serin-Resten spaltet und somit die Anheftung der Zellen an Kulturflaschen und die Zell-Zell-Verbindungen löst. Die Ablösung der Zellen wurde lichtmikroskopisch kontrolliert und durch vorsichtiges Klopfen gegen die Flaschenwand geringfügig beschleunigt.

Nach einer Einwirkzeit von fünf Minuten wurde das Trypsin mit 5 ml Medium neutralisiert und die gesamte Lösung in ein 15ml Falcon Tube überführt. Um die Zellen zu gewinnen wurde 5 Minuten bei 10000 rpm zentrifugiert und der Überstand abgesaugt. Nach Resuspension der Zellen in 5 ml Medium wurden etwa 10⁴ Zellen in eine neue Kulturflasche mit 15ml frischem Medium überführt.

Nach der Adhäsion der Zellen in den Kulturflaschen wurden sie mit Belinostat und Gemcitabine in verschiedenen Konzentrationen behandelt. Für eine bestimmte Zeit wuchsen sie in einem Medium, das mit Belinostat, mit Gemcitabine oder einer Kombination aus beiden versetzt wurde. Als Kontrolle dienten Zellen, deren Medium mit der entsprechenden Menge an PBS substituiert wurde. Die Dauer der Behandlung variierte je nach Versuchsaufbau und Fragestellung zwischen 24 und 48 Stunden. Der detaillierte Versuchsablauf und die Konzentrationen der Medikamente werden bei den einzelnen Versuchen beschrieben.

Das Chemotherapeutikum Gemcitabine wurde in einer Stock-Solution mit einer Konzentration von 10µM in PBS gelagert, Belinostat wurde in DMSO gelöst zu einer Konzentration von 0,1M. Beide Lösungen wurden bei 4°C aufbewahrt.

2.2.2 Bestimmung der Zellzahl

Nach der Trypsinierung wurden die Zellen in 5 ml Medium resuspendiert. Aus dieser Lösung wurden 50 µl mit der gleichen Menge Trypanblau gemischt. Von dieser Mischung wurden wenige µl in eine Neubauer-Zählkammer eingebracht und die vitalen Zellen in allen vier Quadranten ausgezählt. Durch diese Färbung werden tote Zellen, in welche wegen der zerstörten Plasmamembran Farbmoleküle unselektiv eindringen können, angezeigt. Der Durchschnittswert der vitalen Zellen aus den vier Quadranten kann in die Formel für Zellkonzentration eingesetzt werden:

$$D \times Z \times 10^4 = \text{Zellzahl/ml}$$

D: Verdünnungsfaktor der Zellen mit Trypanblau (hier: 0,5)

Z: Durchschnittswert vitaler Zellen in allen vier Quadranten

2.2.3 Bestimmung der Zellproliferation (MTT-Assay)

Die MTT-Probe ist eine kolorimetrische Untersuchung bei welcher das lösliche Tetrazoliumsalz MTT (gelb, chemisch: 3-(4,5-dimethyl-2-tetrazolyl)-2,5-diphenyl-tetrazoliumbromid) in vitalen Zellen verstoffwechselt wird. Hierbei entsteht als Fällungsprodukt das wasserunlösliche Formazan (Abb. 5). Diese Reaktion, welche im rauen Endoplasmatischen Retikulum stattfindet und einen Farbumschlag von gelb zu violett verursacht, wurde erstmals von T. Mosmann (Mosmann 1983) beschrieben. Dadurch können Aussagen über mitochondriale Aktivität, Zytotoxizität nach Zugabe von Reagenzien sowie Zellwachstum gemacht werden.

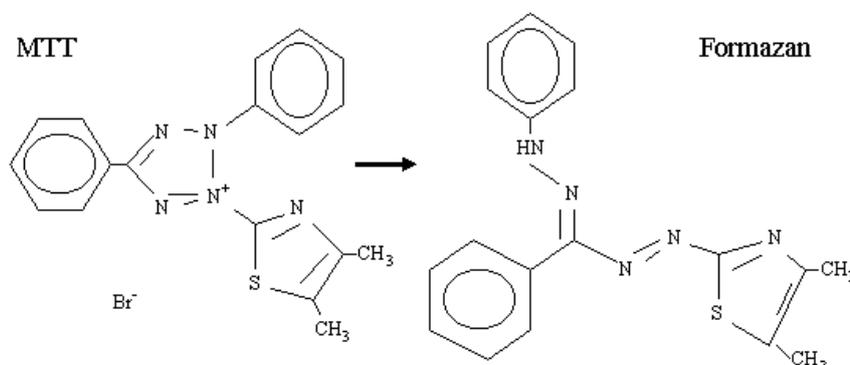


Abbildung 5: Umwandlung von MTT zu Formazan (modifiziert nach Mosmann, 1983)

Material und Methoden

Durchführung: Das MTT-Pulver wurde in 1%igen PBS gelöst und steril filtriert, so dass eine Stock-Lösung mit 5 mg/ml entstand. Zur Versuchsvorbereitung wurden zwei 96-Loch-Platten benötigt. Als Medium wurde DMEM und F12 zu gleichen Teilen verwendet mit 10% fötalem Kälberserum und 1% Penicillin-Streptomycin.

Es wurden jeweils 5000 Zellen in 100 µl Medium pro Vertiefung pipettiert. Sowohl für die Kontrolle als auch für die Versuchszellen wurden jeweils 10 Vertiefungen entsprechend beschickt.

Nach 20 Stunden Inkubation bei 37°C wurde zu den zur Kontrolle vorgesehenen Zellen 20 µl MTT-Lösung pro Vertiefung hinzugegeben und vier Stunden bei 37°C inkubiert. Im Anschluss wurde der flüssige Inhalt der Platten vorsichtig abgesaugt und das ausgefällte Formazan 30 Minuten bei Raumtemperatur getrocknet. Um das Formazan zu lösen wurden je 100 µl Isopropanol und Essigsäure hinzugefügt und 15 Minuten bei Raumtemperatur inkubiert. Nun wurde die optische Dichte bei einer Wellenlänge von 570 nm mit Hilfe eines ELISA- Lesegerätes gemessen (T0-Wert).

20 Stunden nach der Ausbringung wurde zu den Versuchszellen Belinostat, gelöst in DMSO, in den folgenden Konzentrationen hinzugegeben (Tabelle 1) (Tumber, Collins et al. 2007):

Tabelle 1: Behandlungsschema der Tumorzelllinien mit Belinostat für den MTT-Assay

Konzentration [nM]	T3M4	ASPC	Panc-1
25	x	x	
50	x	x	x
100	x	x	x
300	x	x	x
500	x	x	x
800	x	x	x
1000			x

Nach 48 Stunden wurde die MTT-Lösung hinzugefügt und weiter verfahren wie bei der Kontrolle beschrieben (T48).

Für jeden MTT-Assay wurden die einzelnen Experimente immer dreifach durchgeführt.

Die ID50 konnte mit folgender Formel berechnet werden:

$$\text{ID50} = (\text{T48} - \text{T0}) / (\text{C} - \text{T0}) \times 100$$

T48: optische Dichte 48 Stunden nach Einbringung von Belinostat

T0: optische Dichte zum Zeitpunkt 0

C: optische Dichte der unbehandelten Kontrolle nach 48 Stunden

2.2.4 Bestimmung der Apoptoserate (Annexin V-Assay)

Die Quantifizierung der Apoptose erfolgte mittels Annexin V / Propidiumjodid Färbung. Diese Methode ermöglicht es, die früh- bzw. spätapoptotischen von den nekrotischen Zellen zu unterscheiden. Die Detektion dieser Zellen erfolgte mit Hilfe eines FACS-Gerätes (Fluorescence-activated cell sorting, Durchflusszytometer).

Absterbende, noch intakte Zellen können im Gewebe durch Annexin V nachgewiesen werden, wobei dieses Protein spezifisch an Phosphatidylserin (PS) auf der äußeren Zellmembran bindet. Unter normalen Bedingungen findet sich PS auf der zytoplasmatischen Seite der Zellmembran. Bei Beginn der Apoptose dagegen verändert sich der Aufbau der Plasmamembran, so dass PS zunehmend an der äußeren Seite lokalisiert ist und hier durch Annexin V, an das ein Fluoreszenzfarbstoff gekoppelt ist durchflusszytometrisch nachgewiesen werden kann. Um apoptotische von nekrotischen Zellen zu unterscheiden, muss zusätzlich noch eine Färbung mit Propidiumjodid (PI) durchgeführt werden. Diese Farbstoffe dringen in tote Zellen ein und färben die DNA (Herstellerprotokoll von BD Biosciences).

Durchführung: Die Zellen werden nach folgendem Schema 48 Stunden lang behandelt (Stapnes, Ryningen et al. 2007; Dai, Chen et al. 2008):

Tabelle 2: Behandlungsschema der drei Zelllinien für den Apoptoseassay

Konzentration Belinostat [nM]	T3M4	ASPC	Panc-1
100	x	x	x
500	x	x	x
1000		x	x
Gemcitabine: 0,01 mM	x	x	x
Kombination: Gemcitabine 0,01mM + Belinostat 500nM	x	x	x

Nach Trypsinisieren, Abzentrifugieren und Herstellen einer Suspension mit 10^6 Zellen pro ml in FACS-Pufferlösung, wurden daraus 100 μ l in FACS-Röhrchen überführt und mit je 5 μ l Annexin-Reagenz, welches 15 Minuten lichtgeschützt bei Raumtemperatur inkubiert wurde und/ oder mit je 5 μ l PI, welches direkt vor der Messung zugegeben wurde, versetzt. Als Kontrolle dienten Röhrchen mit unbehandelten Zellen, denen (1) weder Annexin noch PI, (2) nur Annexin, (3) nur PI und (4) sowohl Annexin als auch PI zugesetzt wurde. Den behandelten Zellen wurde Annexin und PI zu gleichen Teilen zugesetzt (Abb. 6 & 7).

Die Messung erfolgt am FACS-Gerät LSRII flow cytometer (BD, Heidelberg, Deutschland) im Immunologischen Institut der Universität Heidelberg.

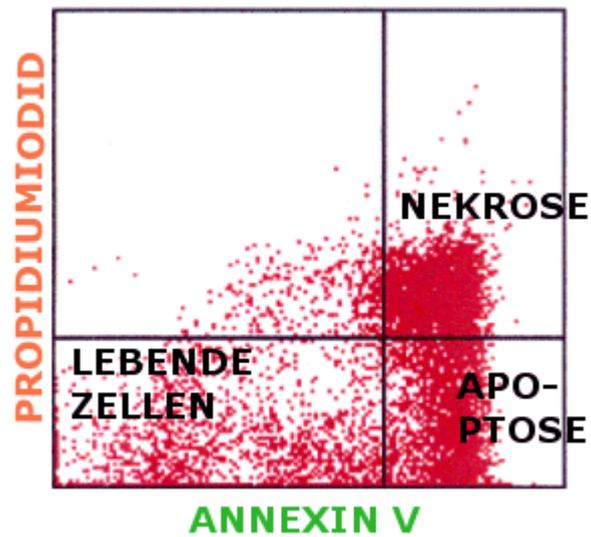


Abbildung 6: Dot-blot (aus Produktionformation von BD Biosciences)

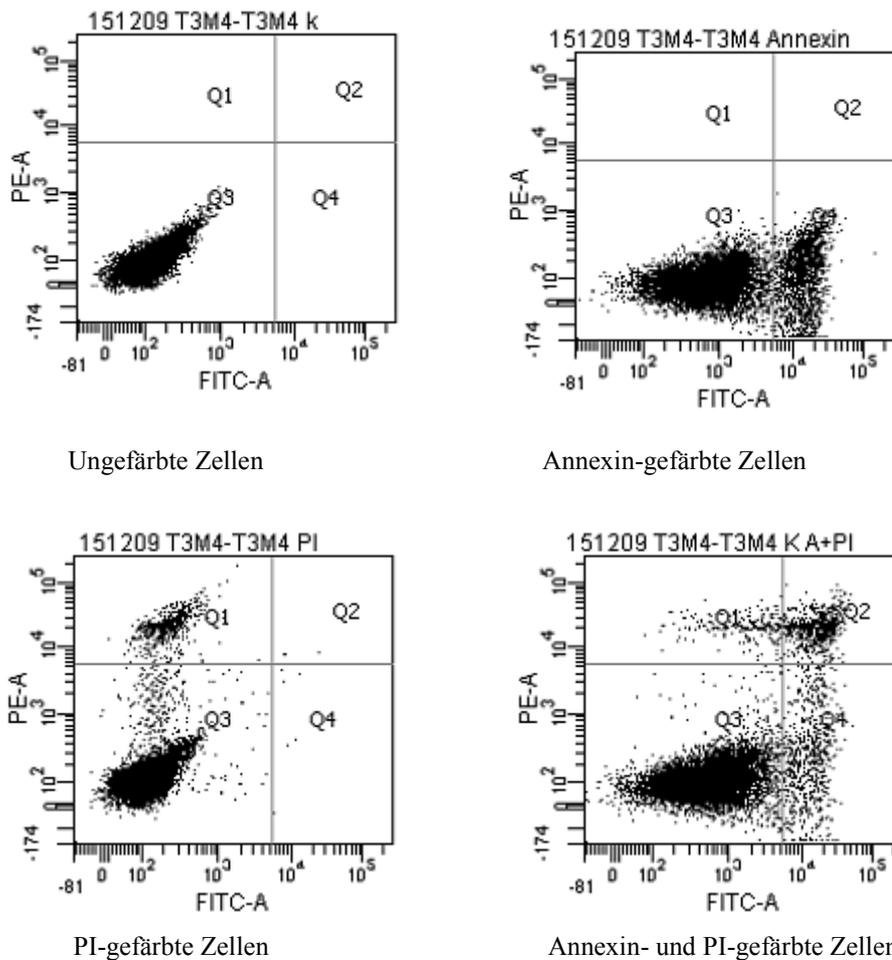


Abbildung 7: Beispiele für Dot-blot-Diagramme unbehandelter Zellen

Q1 Spätapoptose, Q2 Nekrose, Q3 Lebende Zellen, Q4 Frühapoptose

2.2.5 Immunologische Verfahren

2.2.5.1 Expression von H4 (Western Blot)

Die Western Blot-Methode nach Towbin et al. (Towbin, Staehelin et al. 1979) dient dem immunologischen Nachweis spezifischer Proteine. Hierbei werden die in den Zellhomogenaten enthaltenen Proteine durch Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE) nach ihrem Molekulargewicht elektrophoretisch aufgetrennt und anschließend auf eine Membran transferiert. An der Membranoberfläche bleiben sie aufgrund hydrophober Wechselwirkungen haften und die Proteine können mit Hilfe verschiedener Antikörper nachgewiesen werden.

Durchführung: Die Zellen wurden über 24 Stunden mit 100nM (T3M4, ASPC) bzw. 300nM (Panc-1) Belinostat behandelt.

Zur Proteinextraktion wurden die Zellen zunächst in PBS gewaschen und nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten in 100µl SDS-Lyse-Puffer auf Eis mit Hilfe von Zellschabern abgelöst. Zur Proteindenaturierung wurde die Probe 10 Minuten bei 96°C erhitzt. Nach 2 Minuten Zentrifugieren bei 10000 rpm wurde der Überstand in ein neues Eppendorf Röhrchen gegeben und das Zellpellet verworfen.

Zur Proteinbestimmung wurden 5µl (1x ohne Verdünnung, 1x in der Verdünnung 1:5) Aliquot abgenommen und mit BCA-Lösung versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 30 Minuten bei 37°C fand die Auswertung am FluoStar Optima (BMG Labtech) statt.

Für die Western Blot Analyse wurden 40µg Proteinlösung benötigt (20µl Protein und Lyse-Puffer + 1µl Bromphenolblau).

Die Elektrophorese wurde in selbst gegossenen Gelen durchgeführt. Hierzu wurde zunächst das Trenngel in eine 1mm Glasplattenkammer gegossen, so dass die Flüssigkeit 1 cm unterhalb des Kammes stand. Das Gel wurde mit Wasser überschichtet. Nach einer Trockenzeit von 30 Minuten wurde das Wasser abgegossen und das Sammelgel fertig gestellt. Der Kamm wurde zunächst schräg eingesteckt, das Sammelgel vorsichtig eingefüllt und dann der Kamm heruntergedrückt. Nach einer Wartezeit von 25 Minuten war das Sammelgel fest und die Kämme konnten herausgezogen werden. Nach einer Wasserspülung wurden die Glasplatten eingespannt und in die Plexiglaskammer gestellt.

Die Proben wurden ebenso wie 10µl Bench Marker in die Kammern gegeben.

Die Elektrophorese wurde zunächst 15 Minuten bei 80V, dann 120 Minuten bei 100V durchgeführt.

Der Blot-Vorgang erfolgte für 120 Minuten bei 35 mA in Transferpuffer.

Im Anschluss wurde die Membran zunächst fünf Minuten lang mit TBS gewaschen, dann 5 Minuten mit Ponceau-Färbung gefärbt um den Erfolg des Blottings zu überprüfen. Nun wurde die Membran so lange mit TBS gewaschen bis die Lösung klar war.

Das Blocking fand in 2%iger Milchpulverlösung (Non fat dry milk) für 1 Stunde statt.

Der Primäantikörper Histon H4ac wurde in einer Verdünnung von 1:75000 in 2% TBS-Milch bei 4°C über Nacht inkubiert.

Am folgenden Tag wurde die Membran zweimal 15 Minuten lang mit TBS-T gewaschen, dann zweimal 10 Minuten mit TBS.

Der Sekundäantikörper donkey anti-rabbit wurde für eine Stunde bei Raumtemperatur in einer Verdünnung von 1:150000 in 2% Milchpulver/TBS inkubiert.

Zur Entwicklung wurde das ECL Detection Kit verwendet. Es wurden jeweils 1,5 ml der beiden Reagenzien gemischt und unter Schwenken eine Minute auf die Membran einwirken lassen. Die Detektion geschah mit Hilfe des Programms ChemiCapt. Die Entwicklungsdauer variierte zwischen 3 Sekunden und 2 Minuten.

Über Nacht erfolgte die Inkubation mit dem Antikörper Actin in der Verdünnung 1: 75000 bei 4°C.

Am darauf folgenden Tag wurde ebenso verfahren wie am vergangenen Tag. Als Sekundäantikörper wurde goat-anti-mouse in der Verdünnung 1:150000 verwendet.

2.2.5.2 Expression von p21 (Western Blot)

Panc-1-Zellen wurden für 24 Stunden mit 300nM Belinostat bzw. mit PBS als Kontrolle behandelt.

Vorbereitung: Die Kulturflaschen mit den behandelten Zellen wurden auf Eis gestellt, das Medium verworfen, die Zellen zweimal mit 4°C kaltem PBS gewaschen und mit 100 µl RIPA-Puffer versetzt. Nach einer Inkubationszeit von 10 Minuten wurden die Zellen mit einem Zellschaber abgelöst und in ein Eppendorf-Tube überführt. Zur Denaturierung der Zellwände wurde die Flüssigkeit mehrmals mit einer dünnen Kanüle angesaugt. Danach wurde für 10 Minuten bei 13200 rpm und 4 °C zentrifugiert. Nur der Überstand wurde in ein neues Eppendorf-Gefäß überführt und sofort verwendet oder bei -20°C eingefroren.

Zur Kontrolle wurden Standards aus Albumin in den Konzentrationen von 2000 bis 0 µl/ml hergestellt.

In eine 96-Lochplatte wurden 25µl von der zu untersuchenden Proteinsuspension, jeweils in Dupletts einpipettiert. Ebenso wurde mit den Albumin-Standards verfahren. Die Proteinbestimmung wurde mit dem BCA Protein Assay Kit durchgeführt. Das Prinzip hierbei ist, dass die in der Reaktion B enthaltenen zweiwertigen Kupferionen durch das Protein in einwertige reduziert werden. Diese bilden mit der Bichinonsäure des Kits einen violetten Komplex. Zu dem Proteingemisch wurden 200µl eines Gemisches der Substratreaktionen A und B im Verhältnis 1:50 zugegeben und 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Platten wurden dann bei 570nm im ELISA-Lesegerät ausgewertet.

Anhand der densitometrischen Messwerte konnte mittels eines Algorithmus die Proteinkonzentration berechnet werden.

SDS-Page nach Laemmli

Die SDS-Page dient der Auftrennung von Proteingemischen nach Molekulargewicht und ermöglicht so die anschließende spezifische Detektion von Proteinen. Dazu müssen die Proteine zunächst mit der Detergenz SDS denaturiert werden. Die meisten Proteine binden SDS und werden zu negativ geladenen SDS-Protein-Komplexen mit konstantem Ladung-zu-Masse-Verhältnis (1,4g SDS/g Protein in 1 % SDS-Lösung). Die Denaturierung der Proteine durch SDS unterbindet sowohl die externe als auch die interne Proteinwechselwirkung. Dieser Prozess wird durch vorherige Reduktion von Disulfidbrücken der Proteine mit β -Mercaptoethanol weiter verstärkt.

Zur Western Blot Analyse wurden 30 µl einer Suspension angefertigt, welche je 30 µg des Proteins in 15 µl RIPA-Puffer, sowie 15 µl Lämmli-Puffer mit Mercaptoethanol 1:20 enthielt. Dieses Gemisch wurde 4 Minuten bei 99°C denaturiert um die Tertiär- und Quartärstruktur der Proteine zu zerstören. Die SDS-Protein-Komplexe verschiedener Proteine unterscheiden sich so nur noch in ihrer Größe und haben vergleichbare hydrodynamische Eigenschaften. Bei der SDS-Elektrophorese wandert der SDS-Protein-Komplex im elektrischen Feld zum Plus-Pol (Anode).

Das Gel wurde nun mit dem denaturierten Gemisch sowie dem Marker (8 µl in eine separate Tasche) beladen.

Die elektrophoretische Trennung wurde in porösen Polyacrylamid-Gelen durchgeführt in denen die SDS-Protein-Komplexe nach ihrem Durchmesser und damit nach ihrem Molekulargewicht aufgetrennt werden. Zum Nachweis von p21 wurde ein 4-12%iges, kommerziell erhältliches Tris-Bis-Gel verwendet, welches bereits aus einem Sammel- und

einem Trenngel besteht. Im Sammelgel werden die Proteine auf gleicher Höhe fokussiert, im Trenngel werden sie auf dem Weg zur Anode separiert.

Die Gelelektrophorese erfolgte in MOPS-Puffer für 50min bei 200V.

Es folgt der sogenannte Blot-Vorgang für 60 Minuten bei 30V in Transfer-Puffer.

Um unspezifische Bindungen zu verhindern, wurde die Membran danach für 1h mit 5% Milch-TBS-T inkubiert.

Daraufhin folgte die Antikörperinkubation anti-p21 (rabbit anti mouse, Abcam) über Nacht bei 4°C auf dem Taumelrollenmischer mit einer 1:200 Verdünnung.

Am folgenden Tag wurde die Membran dreimal in TBS-T sowie einmal in TBS für jeweils 15 Minuten gewaschen.

Mit dem Sekundärantikörper (goat anti-rabbit) in der Verdünnung von 1:2000 in einer Milchlösung wurde eine Stunde bei Raumtemperatur inkubiert.

Es folgten 3 Waschgänge zu je 15 Minuten in TBS-T sowie einer in TBS. Danach erfolgte die Farbreaktion, bei der 1ml der Reagenzien A und B aus dem ECL detection reagent-Kit im Verhältnis 1:1 gemischt wurde. Die Membranen wurden für 60 Sekunden auf dem Schüttler mit der Substratlösung bedeckt. Die Auswertung erfolgt mit Hilfe des Programmes SOP Fusion-SL 3500-WL.

Um die Membran für einen weiteren Antikörper zugänglich zu machen, wurden die beiden vorher aufgetragenen Antikörper entfernt. Dies geschah mit Hilfe eines Stripping Buffers, welcher nach einem Waschgang mit TBS für 15 Minuten bei 37°C 30 Minuten lang auf die Membran einwirkte. Nach dem Waschvorgang mit TBS-T (3x) sowie mit TBS (1x) für jeweils 15 Minuten wurden die freien Bindungsstellen mit Milchlösung für 1 Stunde bei Raumtemperatur geblockt.

Der Antikörper GAPDH wurde über Nacht bei 4°C inkubiert.

Am folgenden Tag wurde die Membran dreimal in TBS-T sowie einmal in TBS für jeweils 15 Minuten gewaschen.

Der Sekundärantikörper goat anti-rabbit wurde in einer Milchlösung bei RT für 1 Stunde aufgetragen.

Nach einem weiteren Waschgang dreimal mit TBS-T und einmal mit TBS für je 15 Minuten erfolgte die Detektion wie bereits beschrieben.

2.2.6 Tierexperimentelle Studie

2.2.6.1 Versuchstiere

Als Versuchstiere wurden sechs Wochen alte, athymische Nacktmausweibchen mit einem Durchschnittsgewicht von 20 g verwendet. Haltung und Fütterung erfolgte im IBF der Universität Heidelberg unter Einhaltung der gültigen Gesetze und Verordnungen zum Tierschutz. In einem Käfig waren jeweils vier Mäuse untergebracht und von der Außenwelt durch ein Filtertop geschützt. Die Haltung und alle Versuche fanden unter speziellen pathogenfreien Bedingungen und konstanter Raumtemperatur statt. Pelletierte Nahrung und Wasser standen ad libitum zur Verfügung.

2.2.6.2 Injektionstechnik

Für die Tumorzellinjektion wurden T3M4 Pankreaskarzinomzellkulturen mit Trypsin/EDTA abgelöst und die Zellen nach Zentrifugieren in PBS resuspendiert.

Die Tiere wurden durch intraperitoneale Verabreichung von Ketavet und Rompun anästhesiert, wobei eine Konzentration von 5 mg Ketamin/kg und 40 mg Xylazin/kg erreicht wurden. Das entspricht 0,1mg Ketamin und 0,8mg Xylazin pro Maus.

Subkutane Injektion: Nach Erreichen der nötigen Narkosetiefe wurde den Mäusen im Bereich der rechten Schulter 100 µl mit 3×10^5 Zellen subkutan injiziert (Abb. 8).

Injektion ins Pankreas: Nach Erreichen des operationsfähigen Zustandes wurde die Bauchhöhle im Bereich der Linea alba eröffnet. Das Pankreas wurde zusammen mit der Milz dargestellt und vorgelagert und 100 µl mit 3×10^5 Zellen T3M4 unter Entstehung einer Blase ins Pankreasgewebe injiziert. Nach Zurückverlagerung der Organe wurde die Bauchhöhle mit Einzelknopfheften und Klammern, welche nach 14 Tagen entfernt wurden, verschlossen.

Nach Beendigung der Injektion wurden die Tiere zur Erholung unter Beobachtung in den Käfig zurückgelegt.



Abbildung 8: Subkutane Injektion der Pankreaskarzinomzellen

2.2.6.3 Medikamente

Für das Tierexperiment wurden folgende Substanzen verwendet:

Belinostat (PXD101) gelöst in L-Arginin mit einer Konzentration von 20 mg/ ml.

Gemcitabine gelöst in PBS mit einer Konzentration von 30 mg/ml.

2.2.6.4 Tierexperimentelles Studiendesign

Nach Tumorzellinjektion erfolgte die Aufteilung der Mäuse am 7. postoperativen Tag in die folgenden Behandlungsgruppen mit jeweils 6 Tieren:

1. Kontrolle subkutane Injektion
2. Belinostat subkutane Injektion
3. Gemcitabine subkutane Injektion
4. Kombitherapie subkutane Injektion
5. Kontrolle Injektion Pankreas
6. Belinostat Injektion Pankreas
7. Gemcitabine Injektion Pankreas
8. Kombitherapie Injektion Pankreas

Belinostat wurde ab dem 7. postoperativen Tag fünfmal wöchentlich intraperitoneal mit einer Konzentration von 2 mg pro 20g verabreicht (Buckley, Yoon et al. 2007). Gemcitabine erhielten die jeweiligen Mäuse zweimal pro Woche intraperitoneal mit einer Konzentration von 3mg pro 20g. Die Kontrollbehandlung mit 0,1ml PBS erfolgte ebenfalls fünf Mal wöchentlich.

Das subkutane Tumorwachstum wurde zwei Mal wöchentlich kontrolliert. Dazu wurden die Tumore mit Hilfe einer Schieblehre in zwei senkrecht zueinander stehenden Durchmessern vermessen. Die Tiere, bei denen der längere Durchmesser größer als 15 Millimeter war oder beide Durchmesser über 10 Millimeter betragen, wurden getötet.

28 Tage nach erfolgter Tumorzellinjektion (21 Tage nach Therapiebeginn) wurde das Experiment mit der Tötung sämtlicher Mäuse beendet. Bei allen Tieren wurde der Tumor entfernt und dessen Größe gemessen.

Für weitere Untersuchungen wurden Tumorpräparate in Formalin fixiert und in Paraffin eingebettet, tiefgefroren oder in RNA-Later gelagert.

2.2.7 Aktivität von KI-67 (Immunhistochemie)

Zur immunhistochemischen Darstellung proliferierender Zellen wurden aus in Paraffin eingebetteten Gewebeproben mittels Mikrotom 3-5µm dicke Schnitte angefertigt. Die Schnitte wurden nach folgendem Protokoll entparaffiniert und rehydriert:

3 × 10 min in Xylol

3 × 10 min Ethanol 100%

10 min in Ethanol 95%

10 min in Ethanol 70%

10 min in Ethanol 50%

5 min waschen in destilliertem Wasser

Anschließend wurden die Schnitte 3 × 5min in Citratpuffer (pH 6,0) in der Mikrowelle bei 500W erhitzt. Nach einer Abkühlungszeit von 20min bei Raumtemperatur wurden sie 10min mit einer 1 × TBS /0,1% BSA-Lösung gewaschen. Um die endogene Peroxidaseaktivität des Gewebes zu hemmen, folgte eine 10minütige Inkubation in einem 3%igen Peroxidaseblock, bestehend aus Wasserstoffperoxid (30%ig) und Methanol (100%ig). Danach wurden die Präparate erneut mit 1 × TBS /0,1% BSA zunächst abgespült und dann 2 × 10min gewaschen. Der verwendete monoklonale Primärantikörper Mouse-anti-human-KI-67 (DAKO) wurde 1:5 mit DakoCytomation Antibody Diluent verdünnt, auf jedes Präparat aufgebracht und über Nacht bei 4°C inkubiert. Als Negativkontrolle diente Mäuse-IgG1 von der Firma Serotec welches in der gleichen Konzentration wie der Erstantikörper verwendet wurde.

Am darauffolgenden Tag wurden die Präparate zunächst mit $1 \times$ TBS / 0,1% BSA / 0,05% Tween 20 ab gespült und anschließend mit der gleichen Waschlösung für 3×10 min gewaschen. Darauf folgte eine erneute Waschung für 10 min mit der $1 \times$ TBS / 0,1% BSA-Lösung. Mit dem nun aufgebrauchten Anti-mouse Sekundär-Antikörper (DAKO) wurde für 45 min inkubiert und anschließend ab gespült. Nach 5×10 min waschen mit $1 \times$ TBS / 0,1% BSA / 0,05% Tween 20 und 2×10 min waschen mit $1 \times$ TBS / 0,1% BSA-Lösung erfolgte die Visualisierung mit DAKO-Envision® System. Die Reaktionsdauer betrug 8 – 12 Sekunden. Nach Stoppen der Reaktion in destilliertem Wasser und Gegenfärbung für 10 Sekunden in Mayer's Hämatoxilin, wurden die Präparate für 10 min unter fließendem Wasser ab gespült. Die anschließende Dehydratation erfolgte nach angegebenem Schema:

3 min Ethanol 70%

3 min Ethanol 95%

3×3 min Ethanol 100%

3×5 min Xylol

Zum Schluss wurden die Präparate mit Deckgläschen versehen und befundet. Mit einer computerverbundenen Digitalkamera unter Verwendung des Axio Vision 3.1 Programmes von Zeiss wurden die Präparate fotografiert.

2.2.8 Statistische Analysen

Die Ergebnisse aller Untersuchungen wurden mit Hilfe des Programms GraphPad InStat (GraphPad Software, Inc.), Version 5 ausgewertet.

3 Ergebnisse

Hier wird gezeigt wie der Histondeacetylase-Inhibitor Belinostat die Proliferation der verwendeten Pankreaskarzinomzelllinien T3M4, Panc-1 und ASPC in vitro und in vivo beeinflusst. Weiterhin wird die Wirkung dieses HDAC-Inhibitors auf die Induktion der Apoptose und der Einfluss auf das Tumorwachstum in vivo dargestellt. Darüber hinaus werden Mechanismen untersucht, die der Regulation dieser Faktoren zugrunde liegen könnten. Hierbei wird auf die Expression von H4 sowie von p21 eingegangen.

3.1 Zellproliferation

Die proliferationshemmenden Effekte des HDACi Belinostat auf die drei Pankreaskarzinomzelllinien T3M4, Panc-1 und ASPC wurden in verschiedenen Konzentrationen untersucht. Als Kontrolle diente Standardkulturmedium. Nach 48 Stunden wurde die Zellproliferation mittels MTT-Assay (s. Kap. 2.2.3) bestimmt. Alle Zelllinien zeigten unter Behandlung eine signifikante Reduktion der Proliferation. Aus den Ergebnissen wurde für jeden Wirkstoff die halbmaximale Hemmkonzentration (Inhibitory Concentration 50 % = IC₅₀), d.h. die Konzentration des Wirkstoffes, die eine Abnahme der Zellproliferation auf die Hälfte (50 %) verursacht, für jede Zelllinie berechnet (Abb. 9).

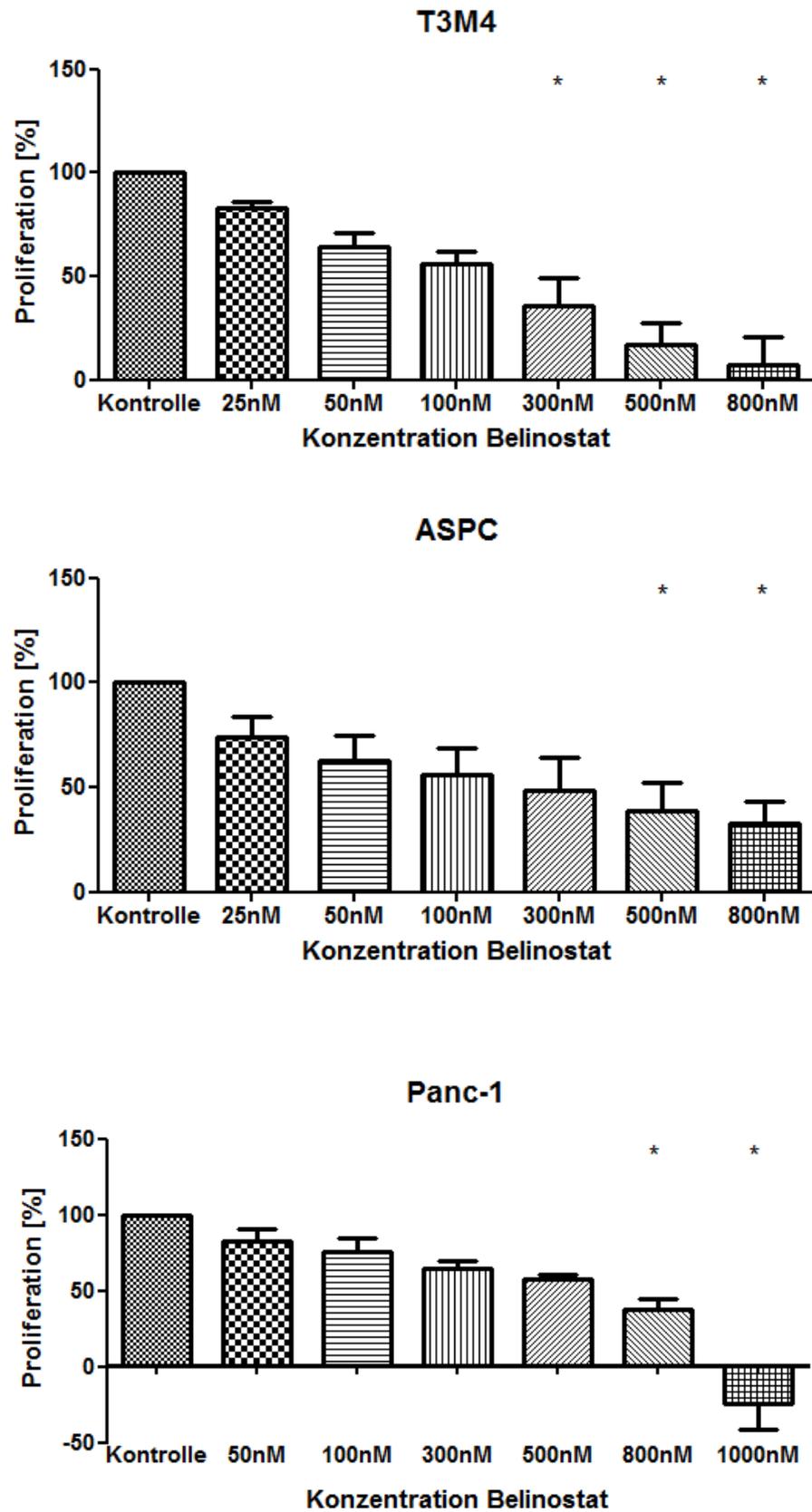


Abbildung 9: Zellproliferation von T3M4-, ASPC- und Panc-1-Zellen nach 48-stündiger Inkubation mit verschiedenen Konzentrationen von Belinostat. Die Ergebnisse sind in Prozent zur Kontrolle (100%) angegeben und dargestellt als Mittelwerte \pm SEM * $p < 0,05$ vs. Kontrolle

Die Zelllinie T3M4 (Abb. 9) zeigte eine signifikante Abnahme der Proliferation ab einer Belinostat-Konzentration von 300nM. 25nM reduzierte die Zellproliferation auf $83\% \pm 2,6$ des Ausgangswertes, 50nM auf $64\% \pm 6,7$, 100nM auf $56\% \pm 5,9$, 300nM auf $36\% \pm 13,5$, 500nM auf $19\% \pm 10,3$, 800nM auf $7\% \pm 13,5$.

Bei der Pankreaskarzinomzelllinie ASPC (Abb. 9) konnte eine signifikante Hemmung der Zellproliferation ab einer Konzentration von 500nM nachgewiesen werden. Eine Konzentration von 25nM reduzierte die Zellproliferation auf $74\% \pm 9,3$, 50nM auf $63\% \pm 11,7$, 100nM auf $56\% \pm 13$, 300nM auf $48\% \pm 15,2$, 500nM auf $38\% \pm 13,5$, 800nM auf $32\% \pm 10,6$.

Nach 48 Stunden Inkubation der Zelllinie Panc-1 (Abb. 9) mit Belinostat zeigte sich eine signifikante Abnahme der Zellproliferation ab einer Belinostat-Konzentration von 800nM. 50nM verursachten eine Hemmung auf $83\% \pm 8$, 100nM auf $76\% \pm 8,3$, 300nM auf $65\% \pm 5$, 500nM auf $57\% \pm 3$, 800nM auf $37\% \pm 7,3$, 1000nM auf $-24\% \pm 17,3$.

Die IC₅₀ lag für Belinostat bei 100nM (T3M4), 200nM (ASPC) bzw. 600nM (Panc-1).

3.2 Apoptoserate

Um den Effekt des HDAC-Inhibitors Belinostat auf die Apoptoserate von PDAC-Zellen zu untersuchen, wurden T3M4-, Panc-1- und ASPC-Zellen mit verschiedenen Belinostat-Konzentrationen behandelt. Die Anteile apoptotischer und nekrotischer Zellen wurden nach 48 Stunden mittels Annexin-V/PI-Färbung und FACS-Analyse bestimmt.

Die Zellen wurden in 6-Loch-Platten ausgesät, nach 24 Stunden Kultivierungszeit wurden Belinostat bzw. Gemcitabine einzeln oder in Kombination zugegeben. Die Wahl der Konzentrationen orientierte sich dabei an den bei der Analyse der Zellproliferation eingesetzten Konzentrationen. So wurden für T3M4-Zellen 100nM und 500nM für die Monotherapie mit Belinostat, 0,01mM für die Monotherapie mit Gemcitabine und 500nM Belinostat + 0,01mM Gemcitabine für die Kombinationstherapie ausgewählt. Die Behandlung von ASPC- und Panc-1-Zellen wurde ebenso durchgeführt, zusätzlich wurde eine Monotherapie mit Belinostat in einer Konzentration von 1000nM untersucht. Nach einer Behandlungszeit von 48 Stunden wurden die Zellen geerntet und wie in Kapitel 2.2.4 beschrieben für die Detektion apoptotischer Zellen im FACS-Durchflusszytometer vorbereitet. Im Folgenden sind die Resultate dargestellt (Abb. 10 bis 12).

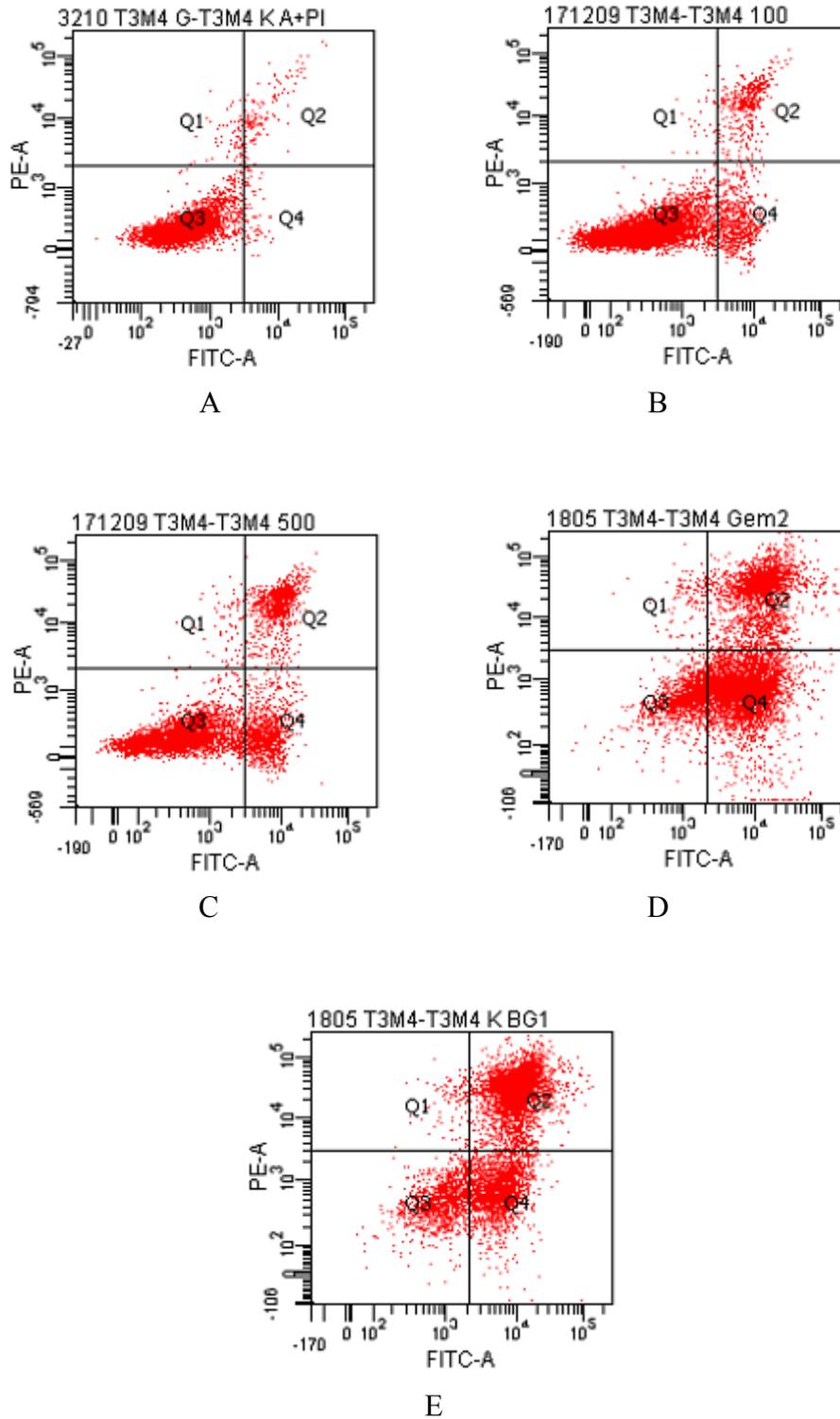


Abbildung 10: T3M4-Zellen blieben unbehandelt (A) bzw. wurden in den Konzentrationen 100nM (B) und 500nM (C) Belinostat, 0,01mM Gemcitabine (D) und 500nM Belinostat + 0,01mM Gemcitabine (E) behandelt.

Dargestellt sind die Dot-Plot Diagramme der FACS Analyse.

Q1: PI-angefärbte Zellen (Nekrose), Q2: Annexin + PI-angefärbte Zellen (Spätapoptose), Q3: ungefärbte Zellen (lebend), Q4: Annexin-angefärbte Zellen (Frühapoptose)

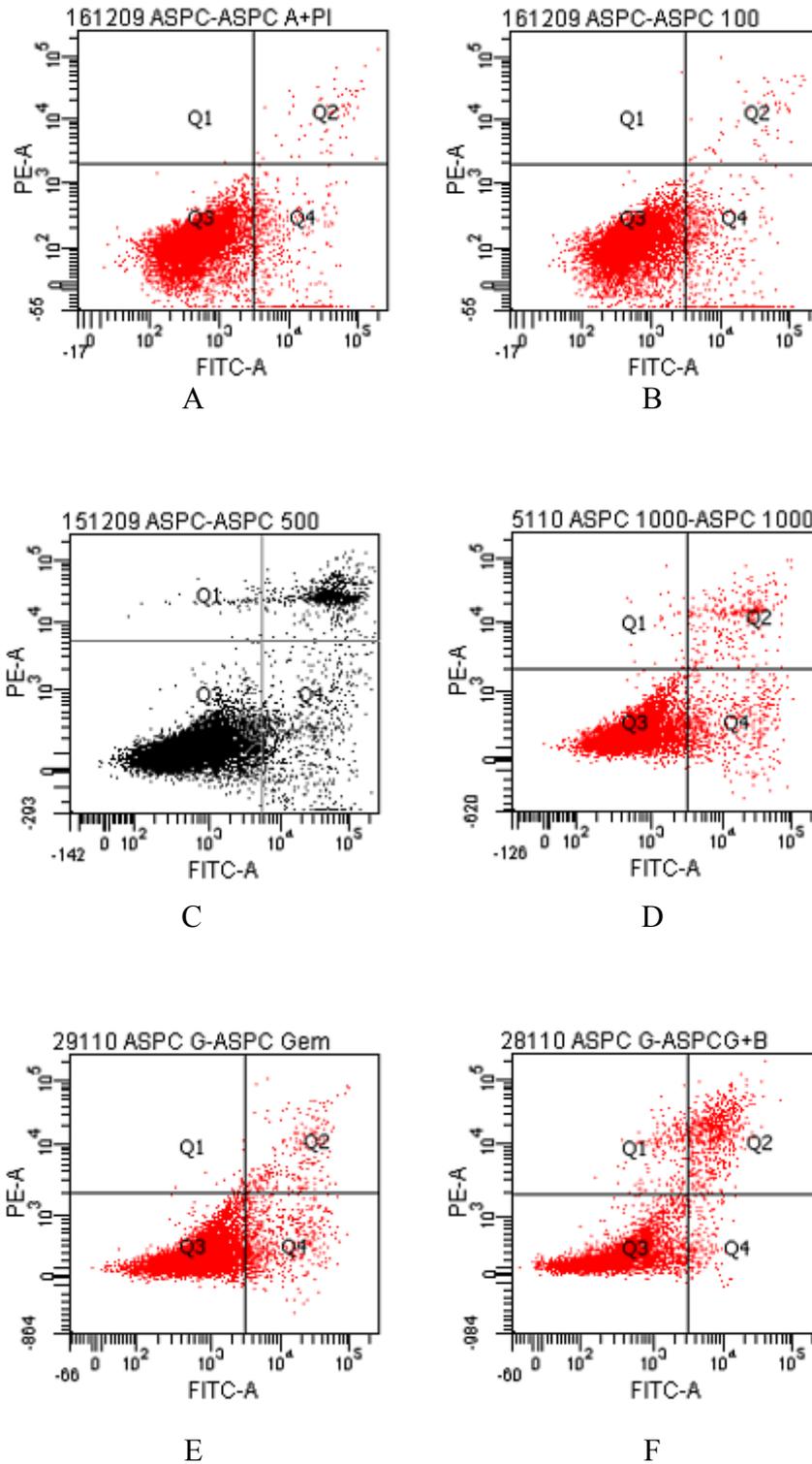


Abbildung 11: ASPC-Zellen blieben unbehandelt (A) bzw. wurden in den Belinostat-Konzentrationen 100nM (B), 500nM (C) und 1000nM (D), 0,01mM Gemcitabine (E) und 500nM Belinostat + 0,01mM Gemcitabine (F) behandelt.

Dargestellt sind die Dot-Blot Diagramme der FACS Analyse.

Q1: PI-angefärbte Zellen (Nekrose), Q2: Annexin + PI-angefärbte Zellen (Spätapoptose), Q3: ungefärbte Zellen (lebend), Q4: Annexin-angefärbte Zellen (Frühapoptose)

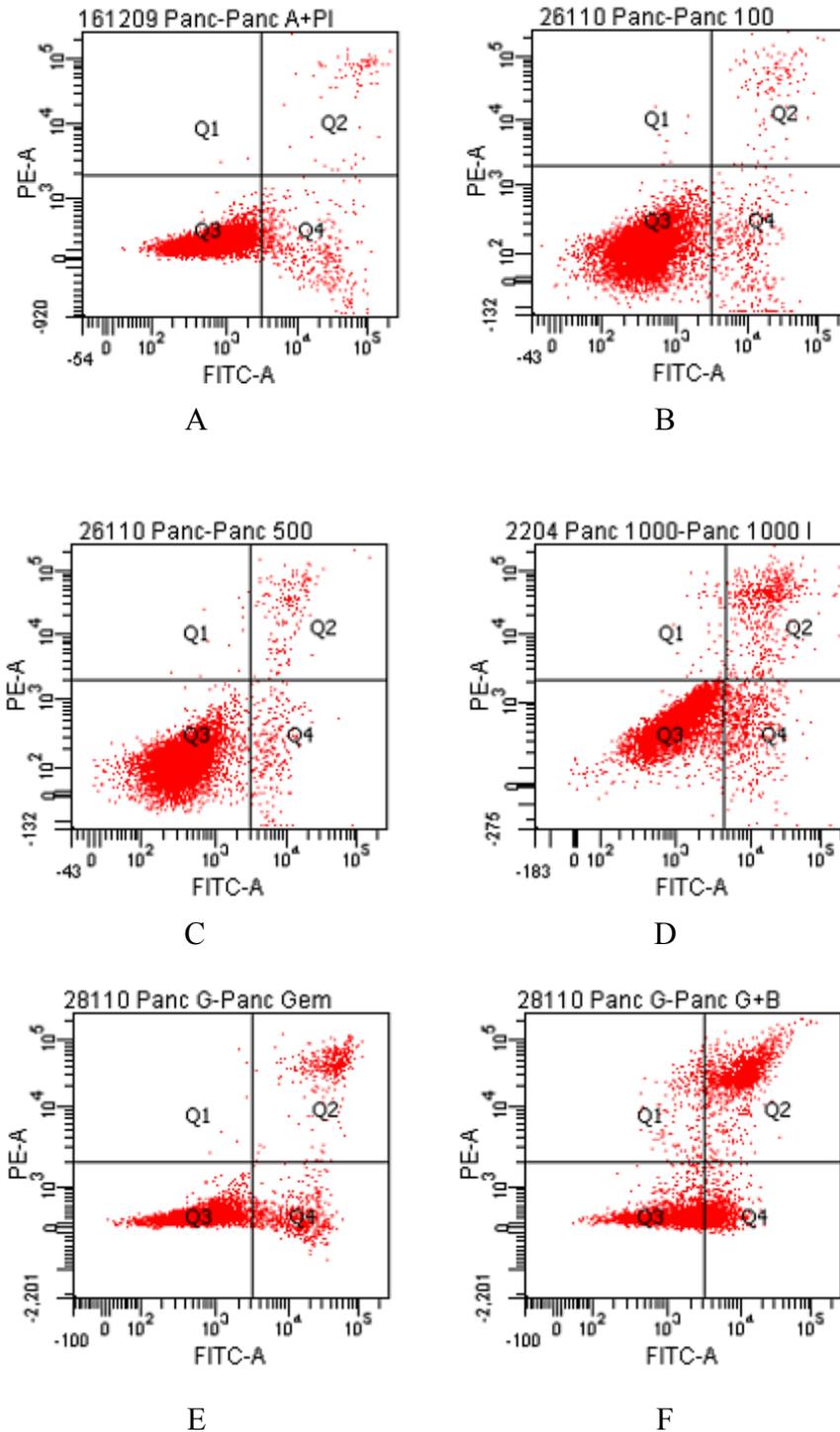


Abbildung 12: Panc-1-Zellen blieben unbehandelt (A) bzw. wurden in den Belinostat-Konzentrationen 100nM (B), 500nM (C) und 1000nM (D), 0,01mM Gemcitabine (E) und 500nM Belinostat + 0,01mM Gemcitabine (F) behandelt.

Dargestellt sind die Dot-Blot Diagramme der FACS Analyse.

Q1: PI-angefärbte Zellen (Nekrose), Q2: Annexin + PI-angefärbte Zellen (Spätapoptose), Q3: ungefärbte Zellen (lebend), Q4: Annexin-angefärbte Zellen (Frühapoptose)

Ergebnisse

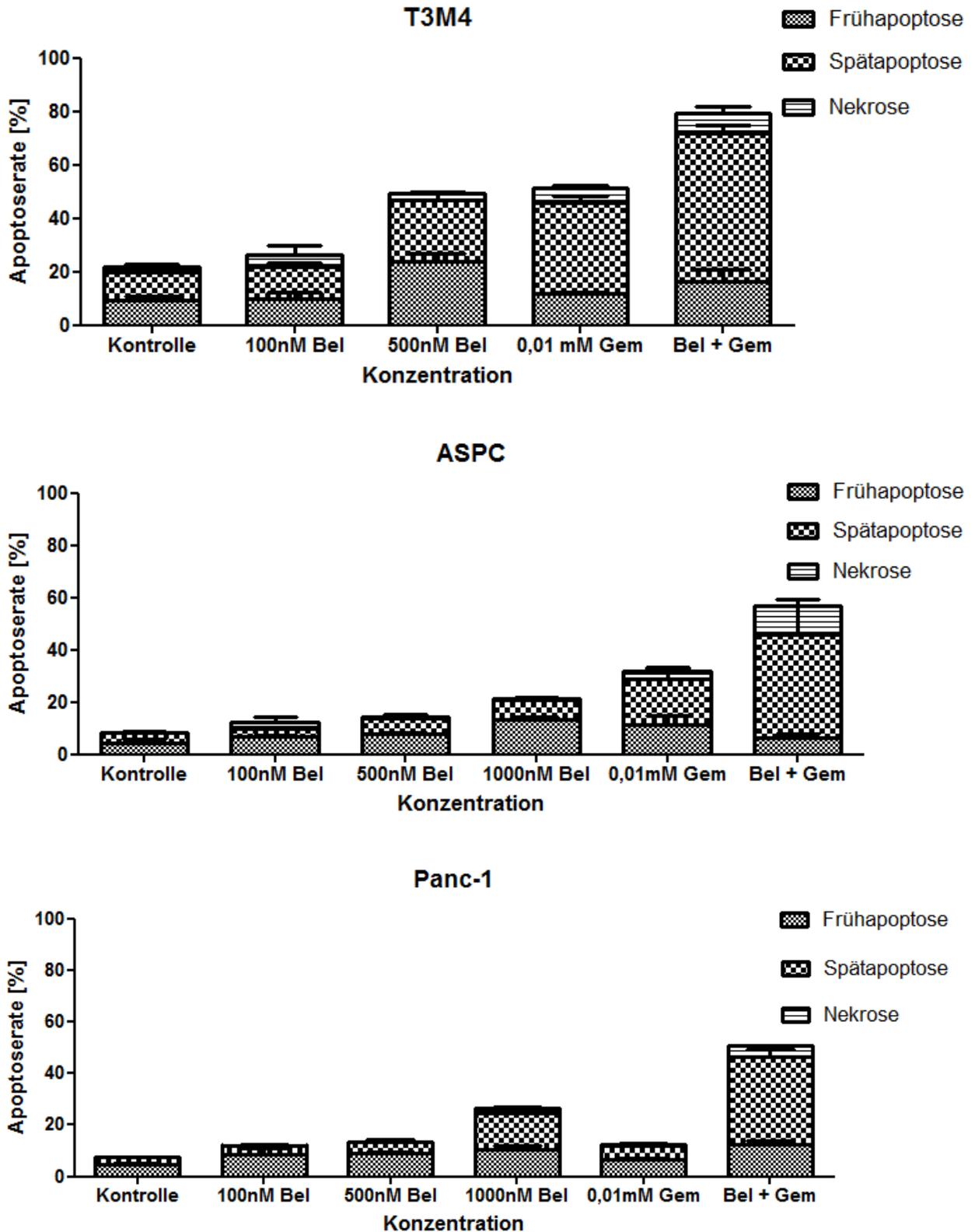


Abbildung 13: Graphische Darstellung der Apoptoserate -aufgeteilt in Früh- und Spätapoptose sowie Nekrose - der mit Belinostat und/ oder Gemcitabine behandelten Zellen.

PDAC-Zellen wurden kultiviert und mit unterschiedlichen Belinostat-Konzentrationen behandelt. Die Kombinationsbehandlung erfolgte mit 500nM Belinostat und 0,01mM Gemcitabine. Nach 48 Stunden wurde eine Untersuchung der Vitalität mit Annexin-V und PI mittels FACS vorgenommen.

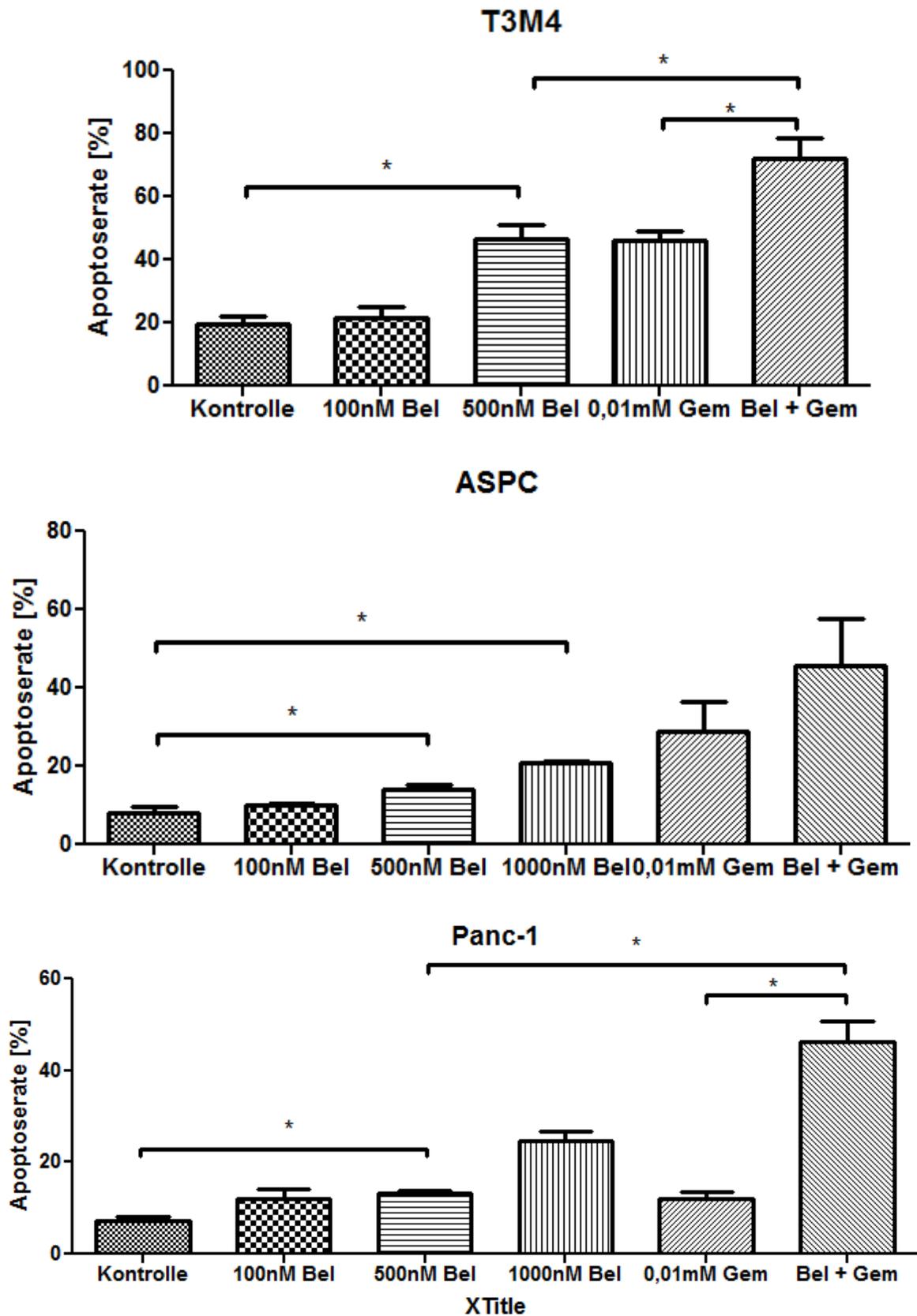


Abbildung 14: Apoptoserate (Früh- und Spätapoptose zusammengefasst) der Zelllinien T3M4, ASPC und Panc-1 nach der Behandlung mit Belinostat, Gemcitabine und einer Kombinationsbehandlung aus beiden Wirkstoffen (500nM Belinostat und 0,01mM Gemcitabine) ebenso wie die Signifikanz der Ergebnisse (waagrechte Balken mit Stern).

Die Behandlung mit Belinostat erhöhte dosisabhängig die Apoptoserate in allen Tumorzellen (Abb. 13 und 14). Die Unterschiede waren signifikant ab der Konzentration von 500nM. Bei der Kombinationsbehandlung mit Gemcitabine zeigte sich eine zunehmende proapoptotische Wirkung. In den Zelllinien T3M4 und Panc-1 führte die Kombinationsbehandlung zu einer signifikanten Steigerung der Apoptose im Vergleich zur Behandlung mit den einzelnen Substanzen.

Bei der Zelllinie T3M4 zeigten sich bei einer Konzentration von 100nM Belinostat $21,7\% \pm 3,3$ der Zellen apoptotisch. Die getestete Konzentration von 500nM Belinostat erhöhte die Apoptoserate um $46,7\% \pm 4,2$ nach 48 Stunden. Die Behandlung mit 0,01mM Gemcitabine ergab eine Erhöhung um $46\% \pm 2,8$. Die Kombinationstherapie bewirkte einen Anstieg um $72\% \pm 6,4$. Eine signifikante Erhöhung zeigte sich bei der Kombinationsbehandlung im Vergleich zur Monotherapie mit 500nM Belinostat bzw. 0,01mM Gemcitabine.

Die Behandlung von ASPC-Zellen mit 100nM Belinostat bewirkte einen Apoptose-Anstieg um $10\% \pm 0,4$, mit 500nM um $13,9\% \pm 1,2$. Eine Behandlung mit 1000nM Belinostat zeigte eine Erhöhung um $20,9\% \pm 0,4$. Gemcitabine steigerte die Apoptoserate auf $28,9\% \pm 7,6$ und die Kombinationsbehandlung bewirkte eine signifikante Zunahme auf $45,6\% \pm 12,1$.

Die Zelllinie Panc-1 zeigte bezüglich der Anzahl apoptotischer Zellen ähnliche Veränderungen. Konzentrationen von 100nM und 500nM Belinostat führten zu einer Erhöhung um $12\% \pm 2,0$ bzw. $13,2\% \pm 0,5$. Eine Behandlung mit 1000nM Belinostat erhöhte die Apoptoserate signifikant um $24,6\% \pm 2,1$. Die Monotherapie mit Gemcitabine bewirkte einen Anstieg um $12\% \pm 1,6$. Die Kombination aus Belinostat und Gemcitabine brachte nicht nur eine signifikante Erhöhung apoptotischer Zellen von $46,2\% \pm 4,4$ gegenüber der Kontrolle, sondern auch gegenüber der Monotherapie mit 1000nM Belinostat bzw. 0,01mM Gemcitabine.

Zusammenfassend ergaben die FACS-Untersuchungen, dass Belinostat die Apoptose-Rate bei kultivierten T3M4-, ASPC- und Panc-1-Zellen konzentrationsabhängig erhöht.

3.3 Expression von Histon H4

Um den Einfluss der Behandlung mit Belinostat auf die HDAC-Aktivität zu untersuchen, wurde als zelltypunabhängiger Indikator die Acetylierung der Histon-Proteine untersucht.

Die Pankreaskarzinomzelllinien T3M4, Panc-1 und ASPC wurden unbehandelt bzw. mit 100nM (T3M4, ASPC) oder 300nM (Panc-1) Belinostat kultiviert. Nach 24 Stunden wurden die Histone isoliert und mittels Western Blot-Analyse die Acetylierung von Histon H4 untersucht. Das Standardkulturmedium diente als Negativkontrolle und Trichostatin A (TSA) als Positivkontrolle (nicht dargestellt).

Es zeigte sich, dass Belinostat im Vergleich zur unbehandelten Kontrolle die Acetylierung der Histon-Proteine erhöht (Abb. 15). Bei T3M4 stieg der Anteil an acetyliertem H4 auf etwa 140% gegenüber der unbehandelten Kontrolle. Bei ASPC auf etwa 185% und bei Panc-1 sogar auf über 210%.

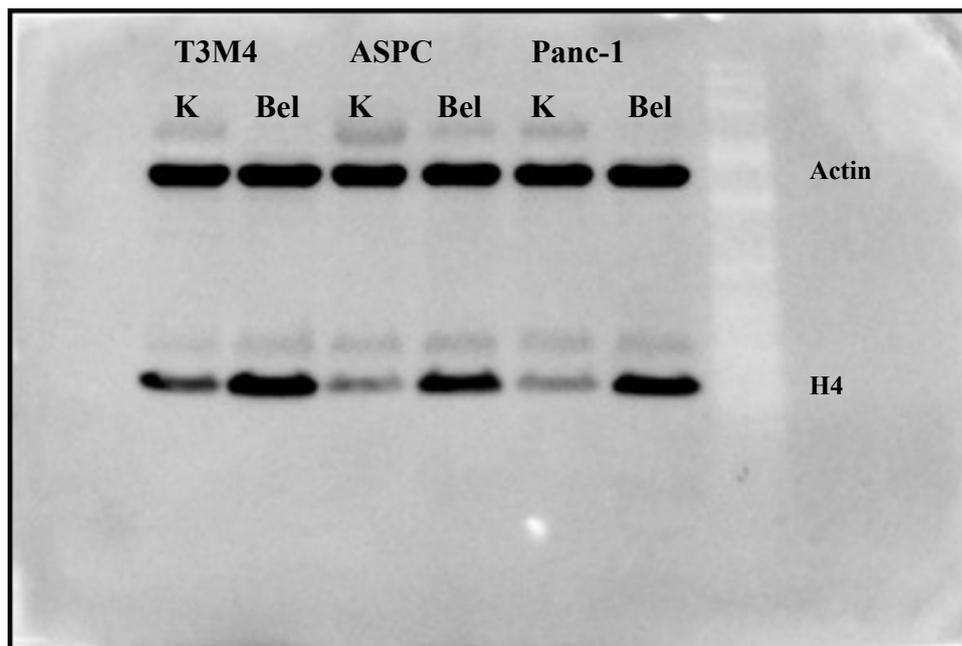


Abbildung 15: Western Blot der Acetylierung von Histonen
Aus unbehandelten und behandelten PDAC-Zellen wurden nach 24 Stunden Kultivierung Histone isoliert und mit Antikörpern gegen acetyliertes Histon H4 analysiert, Actin diente als Mengenkontrolle des Gesamtproteins.

3.4 Expression von p21

Um den Einfluss der Behandlung mit Belinostat auf den Zellzyklus zu untersuchen, wurde die Expression des Proteins p21 untersucht.

Die Pankreaskarzinomzelllinie Panc-1 wurde unbehandelt bzw. mit 300nM Belinostat kultiviert. Nach 24 Stunden wurden die Proteine isoliert und mittels Western Blot-Analyse die Expression von p21 untersucht. Das Standardkulturmedium diente als Negativkontrolle (K) und Trichostatin A (TSA) als Positivkontrolle (nicht dargestellt).

Es zeigte sich, dass in der Zelllinie Panc-1 eine Hochregulation der Expression von p21 stattfand (Abb. 16).

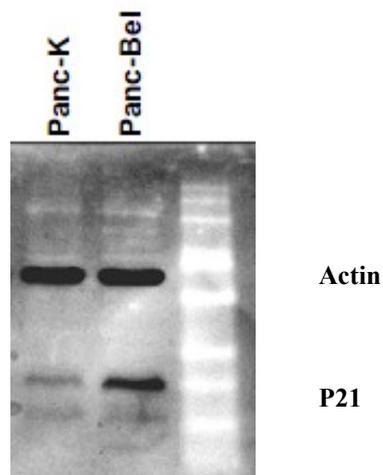


Abbildung 16: Expression von p21 nach der Behandlung mit Belinostat

3.5 Einfluss von Belinostat auf das Tumorwachstum im Mausmodell

Den athymischen Nacktmäusen wurden unter Narkose je 300000 Zellen der Pankreaskarzinomzelllinie T3M4 entweder direkt in das Pankreas oder subkutan im Bereich der rechten Schulter injiziert. Die Versuchstiere wurden in je vier Untergruppen – Behandlung mit PBS, Belinostat, Gemcitabine oder mit Kombinationstherapie - eingeteilt. Jede dieser Untergruppen bestand aus sechs Mäusen. Die Therapie erfolgte ab dem 8. Tag nach Tumorinokulation für 21 Tage intraperitoneal, ebenso wurde ab diesem Zeitpunkt die Größe der subkutanen Tumore zweimal wöchentlich dokumentiert.

Bei keinem der Tiere ergaben sich operative oder postoperative Komplikationen. Die OP-Wunden heilten problemlos.

Alle Mäuse zeigten 13 Tage nach Tumorzellinjektion ein deutlich palpables Pankreaskarzinom bzw. 8 Tage nach subkutaner Injektion einen deutlich sichtbaren Tumor unter der Haut.

28 Tage nach Tumorinokulation wurden die Tiere getötet, die Tumore entnommen und vermessen (Abb. 17 & 18).



Abbildung 17: Subkutaner Tumor im Mausmodell, 28 Tage nach Zellinjektion



Abbildung 18: Pankreastumor im Mausmodell, 28 Tage nach Zellinjektion

3.5.1 Tumorfläche der Mäuse mit subkutanen Tumoren

Die Behandlung mit PBS erfolgte fünfmal wöchentlich intraperitoneal. Bei der Kontrollgruppe betrug die maximale Fläche der subkutanen Tumore $325,7 \text{ mm}^2 \pm 66,8$ (Abb. 19).

Nach Behandlung mit Belinostat (5x wöchentlich, i.p.) zeigte sich 28 Tage nach erfolgter Tumorzellinjektion (21 Tage nach Therapiebeginn) eine Tumorgöße von $158,2 \text{ mm}^2 \pm 40,8$. Bei der alleinigen Verabreichung von Gemcitabine (2x wöchentlich, i.p.) wurde eine durchschnittliche Pankreastumorfläche von $102,5 \text{ mm}^2 \pm 43,2$ erreicht. In der mit Belinostat und Gemcitabine behandelten Gruppe (Belinostat 5x wöchentlich, i.p.; Gemcitabine 2x wöchentlich, i.p.) wurde eine durchschnittliche Tumorgöße von $103 \text{ mm}^2 \pm 27$ erreicht.

Es bestanden keine signifikanten Unterschiede zwischen den Behandlungsgruppen mit Belinostat, Gemcitabine und der Kombination. Der Unterschied zwischen Kontrolle und Behandlungsgruppen war bereits an Tag 15 signifikant.

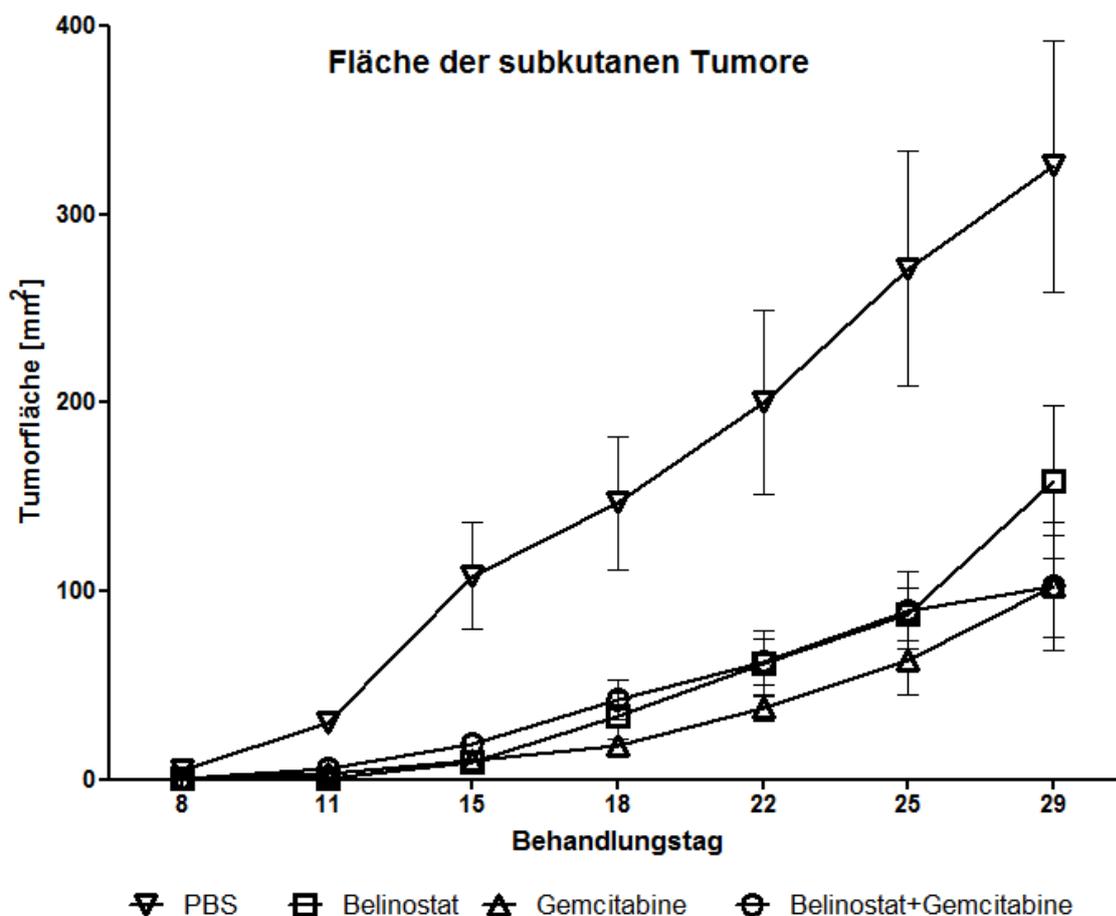


Abbildung 19: Tumorgöße subkutan

Wachstumsdynamik der Xenografttumoren nach der subkutanen Tumorzellinjektion. Nach der Tumorzellinjektion in die Schulter wurden die Tumore mit Messbeginn 8 Tage nach Injektion 2 mal wöchentlich gemessen. Die Tumorfläche wurde ausgerechnet nach der Formel Länge x Breite.

3.5.2 Tumorfläche der Mäuse mit Pankreastumor

Die Behandlung mit Belinostat, Gemcitabine und einer Kombination aus beiden Wirkstoffen zeigte eine signifikante Reduktion des Tumorwachstums im Vergleich zur Kontrolle (Abb. 20). Bei der unbehandelten Kontrollgruppe der Pankreastumore betrug die durchschnittliche Fläche am Ende des Versuches $197 \text{ mm}^2 \pm 45,3$, bei der Belinostatgruppe $130 \text{ mm}^2 \pm 16,4$, bei der Gemcitabinegruppe $66 \text{ mm}^2 \pm 13,9$ und bei der Kombinationsgruppe $49 \text{ mm}^2 \pm 14,6$.

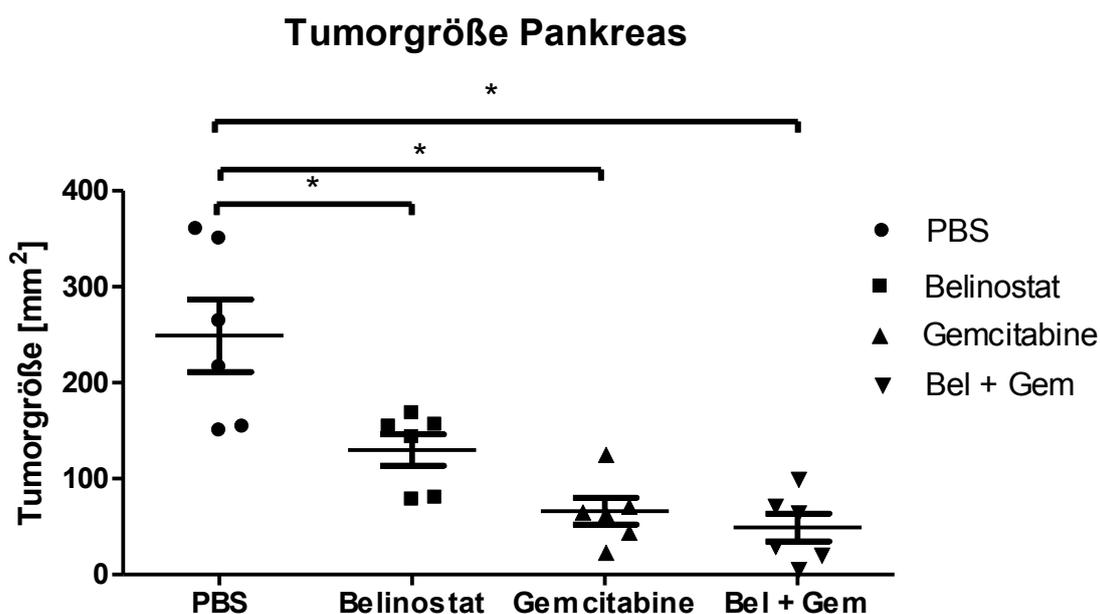


Abbildung 20: Tumorgröße Pankreas

Dargestellt ist die Tumorgröße Länge x Breite des Pankreas am Entnahmetag, 28 Tage nach Injektion.

3.5.3 Entwicklung der Mäusegewichte

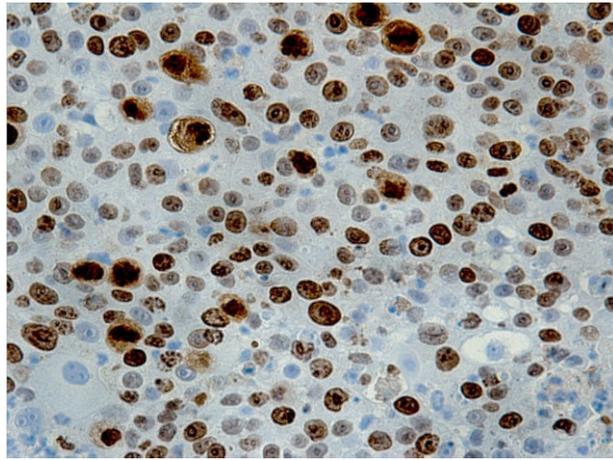
Zur Ermittlung des Körpergewichtes der Mäuse wurden diese zweimal wöchentlich gewogen. Hierbei traten keine signifikanten Unterschiede zwischen Mäusen der unbehandelten Kontrollgruppen und den behandelten Gruppen auf und die Gewichtsentwicklung verlief identisch. In keiner der Gruppen traten Gewichtsabnahmen auf.

3.6 Aktivität von KI-67

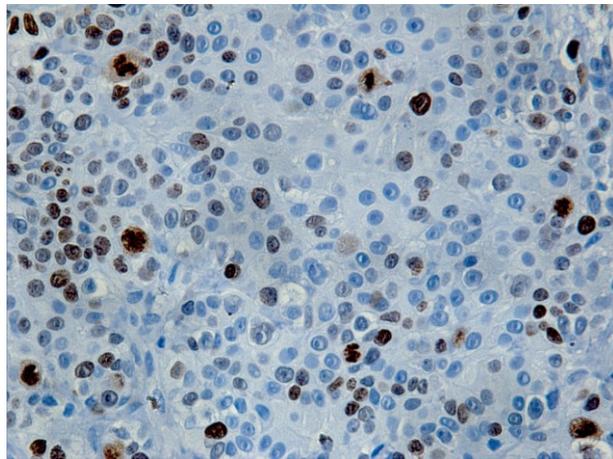
Um die Proliferation der Zellen *in vivo* zu bestimmen wurden aus den subkutanen Tumoren der Mäuse Paraffinserienschnitte hergestellt, an denen mit Hilfe des Antikörpers Mouse-anti-human KI-67 eine immunhistochemische Analyse durchgeführt wurde. Als Negativkontrolle diente Maus-IgG1, welches mit der gleichen Konzentration wie der spezifische Antikörper verwendet wurde. Die Auswertung erfolgte am Lichtmikroskop mit 400-facher Vergrößerung. Je Gruppe wurden Schnitte von 6 verschiedenen Mäusen ausgewertet. Je Schnitt wurden 3 verschiedene Stellen mit Tumorgewebe ausgewählt und der Anteil von proliferierenden und nicht proliferierenden Zellen bestimmt.

In der Kontrollgruppe zeigte sich eine hohe Anzahl mitotischer Zellen ($79\% \pm 2,2$). Im Gegensatz dazu konnte man mit nur noch $48\% \pm 5,7$ proliferierender Tumorzellen einen signifikanten Rückgang nach der Behandlung mit Belinostat beobachten.

Die Abbildung 21 zeigt den Schnitt durch einen unbehandelten (A) und behandelten (B) Tumor. In letzterem (B) sind wesentlich weniger Zellen durch den Antikörper KI-67 angefärbt, so dass deutlich wird, dass die Anzahl proliferierender Zellen durch die Belinostat-Behandlung reduziert wird. Abbildung 22 zeigt die prozentuale Verteilung dieser Zellen. Sichtbar ist, dass der Anteil an nicht proliferierenden Zellen in der Behandlungsgruppe größer ist als in der Kontrollgruppe.



A



B

Abbildung 21: Schnitt der Tumore nach Färbung mit KI-67, 400-fache Vergrößerung
A: unbehandelte Tumore, B: mit Belinostat behandelte Tumore

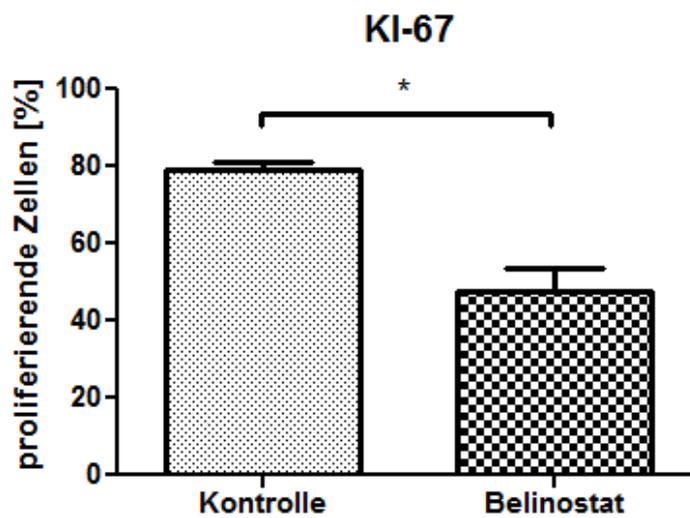


Abbildung 22: Quantifizierung der proliferierenden Zellen nach KI-67 Färbung

4 Diskussion

Das fortgeschrittene Pankreaskarzinom ist mit einer Fünfjahresüberlebensrate von unter 5% (Jemal, Siegel et al. 2010) eine in den meisten Fällen tödlich verlaufende Tumorerkrankung. Zurzeit stellt die chirurgische Resektion die einzige Möglichkeit einer Lebenszeitverlängerung der Patienten dar (Warshaw and Fernandez-del Castillo 1992; Loos, Friess et al. 2009). Bereits zahlreiche Medikamente sind entweder als Monotherapie oder in Kombination mit anderen Therapiemodalitäten auf ihre Wirksamkeit bezüglich Überlebenszeit und Symptomlinderung untersucht worden (Haag and Ehninger 2002). Die Gemcitabine-Monotherapie hat sich seit 1996 als wirksame Therapie durchgesetzt und wurde bisher von keiner anderen Behandlungsmöglichkeit als standardisierte Erstlinienchemotherapie abgelöst (Burris, Moore et al. 1997; Brus and Saif 2010). Ein gegenwärtig intensiv untersuchter Ansatz für eine neuartige Krebstherapie ist die epigenetische Modifizierung der DNA. Es hat sich herausgestellt, dass Histondeacetylase-Inhibitoren in einer Vielzahl von entarteten Zellen Wachstumsstopp, Apoptose sowie teilweise Differenzierung bewirken. Interessanterweise sind gesunde Zellen von diesen Auswirkungen kaum betroffen. HDACi stellen somit potentielle Kandidaten für eine Tumorthherapie dar (Marks, Richon et al. 2004). Die Ergebnisse zahlreicher *in vitro*- und *in vivo*-Studien haben gezeigt, dass HDACi besonders effektiv in Kombination mit weiteren chemotherapeutischen Wirkstoffen sind, darunter auch das Standardchemotherapeutikum Gemcitabine (Marks, Rifkind et al. 2001; Bolden, Peart et al. 2006). Obwohl der konkrete molekulare Mechanismus der anti-neoplastischen Wirkung von HDACi und die beobachtete Spezifität für transformierte Zellen noch nicht völlig klar sind, wird eine Vielzahl von HDACi gegenwärtig, zum Teil erfolgreich, in klinischen Studien getestet (Prince, Bishton et al. 2009). Ein bisher wenig erforschter neuer HDACi aus der Klasse der Hydroxamsäuren ist Belinostat, das durch seine Wirkung auf Zellproliferation, Apoptose, Zelldifferenzierung und Angiogenese ein viel versprechender Ansatz gegen therapieresistente Tumorzellen zu sein scheint (Bolden, Peart et al. 2006). In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss von Belinostat auf PDAC-Zellen sowohl *in vitro* als auch *in vivo* untersucht.

4.1 Einfluss von Belinostat auf die Proliferation von Pankreastumorzellen in vitro

Zur Bestimmung der Proliferation der Pankreaskarzinomzelllinien T3M4, ASPC und Panc-1 in vitro unter Behandlung mit Belinostat in den Konzentrationen 100 bis 1000nM wurde ein MTT-Test durchgeführt. Es konnte eine deutliche konzentrationsabhängige Hemmung der Proliferation nach 48 Stunden Inkubationszeit nachgewiesen werden.

Die IC₅₀ der einzelnen Zelllinien lagen bei 100nM (T3M4), 200nM (ASPC) bzw. 600nM (Panc-1). Dies ist im Vergleich zu anderen Zelllinien, welche mit Belinostat behandelt wurden, äußerst niedrig und zeigt, wie effektiv dieser HDACi schon in geringer Konzentration auf die untersuchten Zellen wirkt.

In Prostatakarzinomzellen lag die IC₅₀ bei 180 bis 950nM (Qian, Ara et al. 2008), in HeLa-Zellen bei unter 2µM (Khan, Jeffers et al. 2008). Buckley et al. fanden heraus, dass die IC₅₀ von Blasenkarzinomzellen bei einer Behandlung mit Belinostat zwischen 1 bis 10µM lag (Buckley, Yoon et al. 2007).

Auch bei Leukämie-, Mantelzelllymphom- und Hepatozellulärzellen konnte erst mit einer höheren Belinostat-Konzentration als in den hier untersuchten PDAC-Zellen eine sinkende Proliferationsrate erreicht werden (Stapnes, Rynningen et al. 2007; Ma, Sung et al. 2008; Kim, Kim et al. 2009).

An verschiedenen Tumorzellen konnte der Nachweis über einen positiven Einfluss der Belinostat-Therapie in Verbindung mit einem anderen Medikament erbracht werden. Tumber et al. testeten die Kombination von Belinostat mit 5-Fluorouracil an Kolonkarzinomzellen. Es ergab sich eine deutliche Proliferationshemmung gegenüber der Monotherapie mit 5-Fluorouracil (Tumber, Collins et al. 2007). Die Therapie von Plattenepithelkarzinomzellen mit einer Kombination aus Belinostat und Bortezomib, einem Proteaseinhibitor, zeigte eine signifikante Erniedrigung der Zellproliferation im Vergleich zur Monotherapie mit den beiden Einzelstoffen und zur Kontrolle (Duan, Friedman et al. 2007).

Der Einfluss von Belinostat auf PDAC-Zellen wurde bis jetzt noch nicht untersucht. Andere HDACi haben jedoch ihre Wirksamkeit in verschiedenen Experimenten gezeigt. So konnte bereits bei der Behandlung von Pankreaskarzinomzellen mit dem HDACi SAHA eine antiproliferative Aktivität festgestellt werden (Chen, Lopez-Sanchez et al. 2008).

Zusammenfassend hemmt Belinostat die Proliferation der untersuchten PDAC-Zellen in vitro. Die im Vergleich zu anderen Zellen niedrigere IC50 lässt sich durch die mögliche höhere Sensitivität dieser Zellen gegenüber Belinostat erklären.

4.2 Einfluss von Belinostat auf die Apoptoserate von Pankreastumorzellen

Wichtigstes Ziel einer kurativen Chemotherapie ist die Zerstörung und Eliminierung sämtlicher Tumorzellen. Es ist bekannt, dass die Wirkung der meisten Chemotherapeutika und auch der HDACi darauf beruht, den programmierten Zelltod, die Apoptose, auszulösen (Kern 1998; Johnstone and Licht 2003). Apoptose ist ein aktiver Prozess, der sich vor allem dadurch auszeichnet, dass während des Abbaus der Zellbestandteile die Zellmembran als schützende Hülle erhalten bleibt (Westphal and Kalthoff 2003). Eine Erhöhung der Apoptoserate ist ein wichtiges Kriterium für die Wirkung der HDACi und wurde in der vorliegenden Arbeit mit Hilfe der FACS-Analyse untersucht.

Die Pankreaskarzinomzelllinien T3M4, ASPC und Panc-1 zeigten unter der Belinostat-Behandlung eine dosisabhängige Apoptoseinduktion, die bei T3M4 mit 47% am größten war. Die Kombination mit Gemcitabine führte zu einer additiven proapoptotischen Wirkung und es kam zu einer signifikanten Steigerung der Zahl apoptotischer Zellen gegenüber der Mono-Behandlung, vor allem ebenfalls bei der Zelllinie T3M4 mit 72%.

Ähnliche Befunde konnten auch andere Forschungsgruppen bei der Belinostatbehandlung verschiedener Tumorzelllinien nachweisen. Sowohl bei der Monotherapie mit Belinostat von AML-Zellen (Stapnes, Ryningen et al. 2007) als auch von Hepatozellularkarzinomzellen (Ma, Sung et al. 2008) zeigte sich eine konzentrationsabhängige proapoptotische Wirkung. Bei Kombinationsbehandlungen von Kolorektalkarzinomzellen mit Belinostat und 5-Fluorouracil ergab sich ein synergistischer Effekt beider Wirkstoffe (Tumber, Collins et al. 2007). Bei Leukämiezellen und Mantelzelllymphomzellen wurde bereits unter der Monotherapie mit Belinostat ein Anstieg der Apoptoserate erreicht. Dieser konnte noch einmal signifikant erhöht werden unter der Kombinationstherapie mit Bortezomib (Dai, Chen et al. 2008; Paoluzzi, Scotto et al. 2010).

Bei der Behandlung von Pankreaskarzinomzellen mit verschiedenen HDACi konnten ähnliche Wirkungen in Bezug auf die Apoptose beobachtet werden. So kam es nach Inkubation mit TSA zu einer Apoptoseinduktion auf Grund einer erhöhten Expression

verschiedener Caspasen und p21. Durch SAHA wurden in sechs verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien sowohl Apoptose als auch Zellzyklusarrest und Differenzierung ausgelöst (Garcia-Morales, Gomez-Martinez et al. 2005). Der synergistische Effekt von TSA und Gemcitabine in Pankreaskarzinomzellen wurde durch eine erhöhte Induktion der Apoptose sichtbar (Donadelli, Costanzo et al. 2007). Auch bei einer Kombinationsbehandlung mit Gemcitabine und 4-Phenylbutyrat wurde in verschiedenen PDAC-Zelllinien ein additiver Effekt auf die Apoptoseinduktion festgestellt (Ammerpohl, Trauzold et al. 2007).

Zusammenfassend zeigen die hier durchgeführten Untersuchungen an Pankreastumorzellen, dass die Wirkung von Belinostat nicht nur darin besteht, Apoptose in den Tumorzellen auszulösen, sondern auch die Zellen für den Einfluss von Gemcitabine zu sensibilisieren. Anzeichen für einen vermehrten nekrotischen Zelltod in Folge der Behandlung mit der Wirkstoffkombination konnten nicht festgestellt werden.

4.3 Einfluss von Belinostat auf die Histonacetylierung

Eine Wirkung der HDACi auf Tumorzellen ist die Acetylierung von Histonen, wodurch über eine Hyperacetylierung direkt Einfluss auf die Genexpression genommen werden kann. Somit dient ein erhöhter Gehalt an acetyliertem Histon H4 in den Zellen als Nachweis, dass es unter der Behandlung zu einer Hemmung der Histondeacetylase kommt und die Entwicklung der Tumorzellen gestört wird (Marks, Richon et al. 2004).

In der vorliegenden Arbeit wurden die PDAC-Zelllinien T3M4, ASPC und Panc-1 auf die Expression von Acetyl-H4 nach der Behandlung mit Belinostat mittels Western Blot untersucht. In allen drei Zelllinien stieg die Acetylierung von H4 im Vergleich zur Kontrolle an. Bei Pankreaskarzinomzellen konnten Emonds et al. ebenfalls eine dosisabhängige Erhöhung der Expression von H4 nach der Behandlung mit TSA nachweisen (Emonds, Fitzner et al. 2010).

Schon in früheren Untersuchungen wurde eine Hyperacetylierung von Histonen unter Belinostat-Behandlung durch den Nachweis von acetyliertem H4 in vivo gefunden. Im Mausmodell führte Belinostat zu einem Anstieg von acetyliertem H4 sowohl im peripheren Blut als auch im Tumor (Plumb, Finn et al. 2003). Ein gleiches Ergebnis konnte bei Mäusen mit Kolon-, Brust-, Prostata- und Lungentumor nach intravenöser Belinostat-Injektion nachgewiesen werden (Marquard, Petersen et al. 2008).

In klinischen Studien der Phase I und II konnte an Patienten mit unterschiedlichen soliden Tumoren gezeigt werden, dass unter der Wirkung von Belinostat der Gehalt an acetyliertem H4 im Blut und im Tumor deutlich anstieg (Mackay, Hirte et al. 2008; Steele, Plumb et al. 2008).

Belinostat begünstigt in PDAC-Zellen den Anstieg der Acetylierung von Histonen. Diese Daten führen zu der Annahme, dass die biologische Effizienz von Belinostat in den verschiedenen Pankreaskarzinomzelllinien mit der erhöhten Expression von H4 korreliert und dieser HDACi somit über eine Hyperacetylierung in den Tumorzell-Stoffwechsel eingreift.

4.4 Induktion von p21

p21 gehört zur Familie der Cyclin-abhängigen-Kinase-Inhibitoren (Cdk-Inhibitoren). Es beeinflusst die Aktivität der Cyclin D-Cdk 4/6-Komplexe und findet sich schon in frühen Pan-IN-Läsionen (Abb. 1) (Biankin, Kench et al. 2001). Außerdem spielt p21 eine entscheidende Rolle bei der Zellantwort auf eine DNA-Schädigung und bei der Regulierung wichtiger Prozesse wie Apoptose und Transkription (Cazzalini, Scovassi et al. 2010). HDAC-Inhibitoren können zur Hochregulation von p21 und somit zur Abnahme der Cyclin D1-Konzentration durch Hemmung der Cdk-Aktivität führen (Theocharis, Kouraklis et al. 2003). Um die Wirkung auf die Expression von p21 durch die Behandlung mit Belinostat nachzuweisen, wurde in der vorliegenden Arbeit die Zelllinie Panc-1 für 24 Stunden mit der IC50 Konzentration von Belinostat inkubiert. Es zeigte sich, dass die Expression von p21 erhöht wurde und im Western Blot nachgewiesen werden konnte.

Die Wirkung von Belinostat auf die Expression von p21 wurde bisher mit unterschiedlichem Ergebnis an verschiedenen Tumoren untersucht. Es konnte bewiesen werden, dass p21 in Zelllinien des Ovarkarzinoms durch die Behandlung mit diesem HDACi hoch reguliert wird (Plumb, Finn et al. 2003). Bei Blasenkarzinomzellen konnte ebenfalls eine erhöhte Expression durch Belinostat beobachtet werden. Bei Zellen des Prostatakarzinoms ergaben sich unterschiedliche Ergebnisse: eine Studie aus dem Jahr 2003 konnte keine erhöhte Expression von p21 nachweisen (Plumb, Finn et al. 2003), wohingegen eine andere Studie aus dem Jahr 2007 eine Induktion feststellen konnte (Qian, Ara et al. 2008). In Zelllinien des kleinzelligen Lungenkarzinoms und des Mammakarzinoms wurden keine erhöhte Expression von p21 gefunden (Plumb, Finn et al. 2003).

Die Wirkung verschiedener HDACi auf Pankreastumorzellen in Bezug auf eine p21-Induktion wurde bereits mit TSA und SAHA untersucht. Bei beiden Behandlungen konnte ein Anstieg der Expression von p21 nachgewiesen werden (Garcia-Morales, Gomez-Martinez et al. 2005; Donadelli, Costanzo et al. 2007; Kumagai, Wakimoto et al. 2007; Emonds, Fitzner et al. 2010).

Belinostat fördert in der PDAC-Zelllinie Panc-1 die p21-Expression. Dieses Ergebnis ist mit der Wirkung dieses HDACi in anderen Studien vergleichbar.

4.5 Einfluss von Belinostat auf das Tumorwachstum in vivo

Um die Hypothese zu überprüfen, dass durch HDAC-Inhibierung eine Reduktion des Tumorwachstums erreicht werden kann, wurde ein in vivo Experiment durchgeführt, in dem Nacktmäuse mit einem orthotrop implantierten T3M4 Pankreastumor mit Belinostat und/oder Gemcitabine behandelt und mit einer unbehandelten Kontrollgruppe verglichen wurden.

Die Bestimmung des Tumorwachstums in athymischen Nacktmäusen erfolgte nach Injektion von Zellen der Pankreaskarzinomlinie T3M4 entweder subkutan an die Schulter oder orthotrop in das Pankreas. Ab dem 8. Tag post injectionem wurden die Mäuse mit Belinostat, Gemcitabine oder einer Kombination aus beiden therapiert und die Größe der subkutanen Tumore zweimal wöchentlich dokumentiert. Den Kontrolltieren wurde entsprechend dem Behandlungsschema PBS-Puffer gespritzt. Nach schmerzloser Tötung der Mäuse wurden die Tumore entnommen und mittels elektronischer Schieblehre in größter Länge und Breite vermessen.

Bei den subkutanen Tumoren ließ sich ein signifikanter Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und den mit Belinostat behandelten Tieren ab dem 15. Tag feststellen. Kein Unterschied zeigte sich allerdings zwischen den einzelnen Behandlungsgruppen. Die Tumorgöße im Pankreas zeigte eine signifikante Verlangsamung des Wachstums unter Behandlung mit Belinostat, mit Gemcitabine und mit einer Kombination der beiden Medikamente gegenüber den unbehandelten Tieren.

An Pankreaskarzinomzellen im Mausmodell wurde bereits eine Kombinationsbehandlung mit TSA und Gemcitabine erfolgreich durchgeführt. Unter dieser Therapie waren die Tumore um 50% kleiner als die der unbehandelten Kontrollgruppe, ohne dabei ein Anzeichen von Toxizität aufzuweisen. Die Monotherapie beider Medikamente blieb ohne messbaren Erfolg (Donadelli, Costanzo et al. 2007).

Unter einer Belinostat-Behandlung konnte im Mausmodell an Ovar-, Blasen- und Prostatakarzinomzellen eine deutliche Wachstumshemmung nachgewiesen werden, ohne dass Toxizität oder ein Effekt auf das Körpergewicht nachgewiesen werden konnten (Plumb, Finn et al. 2003; Buckley, Yoon et al. 2007; Qian, Ara et al. 2008).

An verschiedenen Karzinomzellen gelang es, die Wirkung von Belinostat auf das Wachstum des Tumors durch eine Kombinationstherapie zu verstärken. Kolorektale Tumorzellen zeigten ein signifikant geringeres Tumorwachstum ab dem 28. Behandlungstag (Tumber, Collins et al. 2007). Plattenepithelkarzinom- und Mantelzellymphomzellen wiesen schon unter der Belinostat-Monotherapie eine signifikante Reduktion des Tumorwachstums auf, die durch die Kombination mit Bortezomib noch weiter reduziert werden konnte (Duan, Friedman et al. 2007; Paoluzzi, Scotto et al. 2010). Kombiniert mit Carboplatin führte Belinostat an orthotropen Ovarkarzinomen zu einem dosisabhängigen Antitumoreffekt, der als signifikante Verkleinerung sichtbar wurde (Qian, LaRochelle et al. 2006). Im Mausmodell untersuchten Steele et al. die Wirkung von Belinostat und Decitabine an cisplatinresistenten Ovarkarzinomzellen und konnten eine höhere Effektivität der Kombinationstherapie im Vergleich zu Kontrolle und Monotherapie zeigen (Steele, Finn et al. 2009).

Die hier vorgestellten Untersuchungsergebnisse zur Hemmung des Tumorwachstums an Pankreaskarzinomen unter Belinostat-Therapie zeigen den Einfluss dieses HDACi allein oder in Kombination mit Gemcitabine und bestätigen die Antitumorwirkung auch *in vivo*.

4.6 Nachweis der Proliferation *in vivo* durch KI-67

Um die Zellproliferation *in vivo* zu bestimmen, wurden subkutane Tumore von Mäusen immunhistochemisch mittels Anti-KI-67-Antikörper untersucht. KI-67 findet sich in allen proliferierenden Zellen und ist ein exakter Marker für die Wachstumsfraktion einer gegebenen Zellpopulation (Scholzen and Gerdes 2000). Wie erwartet und im Einklang mit den Ergebnissen des MTT-Tests, führte die Belinostat-Behandlung *in vivo* zu einer Reduktion der Proliferationsrate.

In verfügbaren Literaturquellen konnte nur eine vergleichbare Studie gefunden werden, welche ebenfalls KI-67 in Mäusetumoren untersucht hat. Dabei wurde herausgefunden, dass Belinostat auch in Blasenkarzinomzellen die Proliferation hemmt (Buckley, Yoon et al. 2007).

Belinostat führt also auch *in vivo* zu einer Hemmung der Proliferation von Pankreastumorzellen schon bei relativ geringer Konzentration. Es konnte somit gezeigt werden, dass die Ergebnisse der *in vitro* Versuche auch auf die Bedingungen *in vivo* übertragen werden können.

5 Zusammenfassung

Das Pankreaskarzinom hat auf Grund seiner hohen Mortalitätsrate und trotz verbesserter Diagnose- und Therapiemöglichkeiten nach wie vor eine schlechte Prognose. Neuere adjuvante Behandlungen stellen die Histondeacetylase-Inhibitoren dar, die (über die Histondeacetylase) Einfluss auf die Regulation der Genexpression in Tumorzellen nehmen.

In der vorliegenden Arbeit wurde der Einfluss des neuen Histondeacetylase-Inhibitors Belinostat an einem Pankreaskarzinommodell *in vitro* und *in vivo* untersucht. Dazu wurden *in vitro* die Pankreastumorzellen T3M4, ASPC und Panc-1 und *in vivo* das Modell der athymischen Nacktmäuse verwendet. Zum Einsatz kamen sowohl eine Behandlung mit Belinostat als Monotherapie als auch in Kombination mit dem bereits lange bekannten Chemotherapeutikum Gemcitabine.

Mittels Proliferations-Assay konnte ein hemmender Effekt von Belinostat bei allen Zelllinien gefunden werden. Die Belinostat-Monotherapie führte zu einer Steigerung der Apoptoserate, welche in Kombination mit Gemcitabine noch verstärkt wurde. Eine Erhöhung des Histon H4-Gehaltes in den Tumorzelllinien wurde im Western Blot aufgezeigt, so dass Belinostat über eine Histon-Hyperacetylierung Veränderungen in der Genexpression hervorzurufen scheint. Das Protein P21 als immunmodulatorische Antwort auf Belinostat konnte in Panc-1-Zellen verstärkt gefunden werden.

Bei den *in vivo* Versuchen mit athymischen Nacktmäusen konnte der positive Einfluss von Belinostat an der Reduzierung der Tumorgröße gezeigt werden. Diese korrelierte mit einer Abnahme der proliferierenden Tumorzellen, dargestellt mit Hilfe des Antikörpers KI-67.

In allen durchgeführten Versuchen konnte somit eine erfolgreiche Wirkung von Belinostat nachgewiesen werden.

Die Beobachtungen an den drei Zelllinien und dem Mausmodell lassen erkennen, dass Belinostat ein viel versprechendes Potential als Antitumoragens hat. Im Rahmen dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass die Kombinationsbehandlung mit dem Histondeacetylase-Inhibitor Belinostat und dem Standardchemotherapeutikum Gemcitabine zu verbesserten Ergebnissen bei der Behandlung von Pankreaskarzinomzellen führen kann. Es konnte eine positive Beeinflussung schon bei einer geringen Dosierung und ohne ein Zeichen von Toxizität nachgewiesen werden. Diese Daten rechtfertigen somit die Durchführung weiterer Studien zur Wirkung von Belinostat, um Patienten mit Pankreaskarzinom zu einer besseren Prognose zu verhelfen.

6 Summary

Pancreatic carcinoma is one of the major causes of cancer death. Despite of new diagnostics and new therapy modalities the prognosis remains poor and survival rates have not changed significantly over the last 20 years. As part of a new adjuvant therapy, histone deacetylase inhibitors have been shown to induce specific changes in gene expression of the tumor cells.

This research examines the effect of the new histone deacetylase inhibitor Belinostat in pancreatic cancer models: in vitro pancreatic cancer cells T3M4, ASPC, and Panc-1 and in vivo an athymic nude mouse model. The studies were performed with Belinostat alone as well as in combination with Gemcitabine, a standard chemotherapeutic agent.

These studies suggest a successful effect of Belinostat on pancreatic tumor cells, inducing apoptosis and inhibition of cancer growth.

Therefore, the observations on all three cell lines and the mouse model demonstrate promising potential of Belinostat as an anti tumor agent. The combination of Belinostat and Gemcitabine delivers better results in treatment of pancreatic carcinoma than Belinostat monotherapy or standard chemotherapy alone. The positive effects were already observed at a low dosages without any sign of toxicity.

These results demonstrate that histone deacetylase inhibitor Belinostat is a potential efficient anti-pancreatic cancer drug and legitimates further studies in pancreatic cancer patients.

7 Literaturverzeichnis

- Ammerpohl, O., A. Trauzold, et al. (2007). "Complementary effects of HDAC inhibitor 4-PB on gap junction communication and cellular export mechanisms support restoration of chemosensitivity of PDAC cells." *Br J Cancer* 96(1): 73-81.
- Armeanu, S., A. Pathil, et al. (2005). "Apoptosis on hepatoma cells but not on primary hepatocytes by histone deacetylase inhibitors valproate and ITF2357." *J Hepatol* 42(2): 210-7.
- Arnold, N. B., N. Arkus, et al. (2007). "The histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid induces growth inhibition and enhances gemcitabine-induced cell death in pancreatic cancer." *Clin Cancer Res* 13(1): 18-26.
- Balmain, A. and C. C. Harris (2000). "Carcinogenesis in mouse and human cells: parallels and paradoxes." *Carcinogenesis* 21(3): 371-7.
- Bhalla, K. N. (2005). "Epigenetic and chromatin modifiers as targeted therapy of hematologic malignancies." *J Clin Oncol* 23(17): 3971-93.
- Biankin, A. V., J. G. Kench, et al. (2001). "Overexpression of p21(WAF1/CIP1) is an early event in the development of pancreatic intraepithelial neoplasia." *Cancer Res* 61(24): 8830-7.
- Birkmeyer, J. D., A. E. Siewers, et al. (2002). "Hospital volume and surgical mortality in the United States." *N Engl J Med* 346(15): 1128-37.
- Birkmeyer, J. D., Y. Sun, et al. (2007). "Hospital volume and late survival after cancer surgery." *Ann Surg* 245(5): 777-83.
- Bolden, J. E., M. J. Peart, et al. (2006). "Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors." *Nat Rev Drug Discov* 5(9): 769-84.
- Brus, C. and M. W. Saif (2010). "Second line therapy for advanced pancreatic adenocarcinoma: where are we and where are we going? Highlights from the "2010 ASCO Annual Meeting". Chicago, IL, USA. June 4-8, 2010." *JOP* 11(4): 321-3.
- Buckley, M. T., J. Yoon, et al. (2007). "The histone deacetylase inhibitor belinostat (PXD101) suppresses bladder cancer cell growth in vitro and in vivo." *J Transl Med* 5: 49.
- Burris, H. A., 3rd, M. J. Moore, et al. (1997). "Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial." *J Clin Oncol* 15(6): 2403-13.
- Cazzalini, O., A. I. Scovassi, et al. (2010). "Multiple roles of the cell cycle inhibitor p21(CDKN1A) in the DNA damage response." *Mutat Res* 704(1-3): 12-20.
- Chari, S. T. (2007). "Detecting early pancreatic cancer: problems and prospects." *Semin Oncol* 34(4): 284-94.

- Chen, Y., M. Lopez-Sanchez, et al. (2008). "A series of potent and selective, triazolylphenyl-based histone deacetylases inhibitors with activity against pancreatic cancer cells and *Plasmodium falciparum*." *J Med Chem* 51(12): 3437-48.
- Clark, J. W., A. S. Glicksman, et al. (1996). "Systemic and adjuvant therapy for patients with pancreatic carcinoma." *Cancer* 78(3 Suppl): 688-93.
- Dai, Y., S. Chen, et al. (2008). "Interactions between bortezomib and romidepsin and belinostat in chronic lymphocytic leukemia cells." *Clin Cancer Res* 14(2): 549-58.
- Davie, J. R. (1998). "Covalent modifications of histones: expression from chromatin templates." *Curr Opin Genet Dev* 8(2): 173-8.
- DeLellis, R. A., Lloyd, R.V., Heitz, P.U., Eng, C. (2004). "World Health Organisation: Classification of Tumours, Pathology and Genetics: Tumours of Endocrine Organs." *IARC Press Lyon*.
- Dokmanovic, M., C. Clarke, et al. (2007). "Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives." *Mol Cancer Res* 5(10): 981-9.
- Dokmanovic, M. and P. A. Marks (2005). "Prospects: histone deacetylase inhibitors." *J Cell Biochem* 96(2): 293-304.
- Donadelli, M., C. Costanzo, et al. (2007). "Synergistic inhibition of pancreatic adenocarcinoma cell growth by trichostatin A and gemcitabine." *Biochim Biophys Acta* 1773(7): 1095-106.
- Donadelli, M., C. Costanzo, et al. (2003). "Trichostatin A, an inhibitor of histone deacetylases, strongly suppresses growth of pancreatic adenocarcinoma cells." *Mol Carcinog* 38(2): 59-69.
- Duan, J., J. Friedman, et al. (2007). "Nuclear factor-kappaB p65 small interfering RNA or proteasome inhibitor bortezomib sensitizes head and neck squamous cell carcinomas to classic histone deacetylase inhibitors and novel histone deacetylase inhibitor PXD101." *Mol Cancer Ther* 6(1): 37-50.
- Emonds, E., B. Fitzner, et al. (2010). "Molecular determinants of the antitumor effects of trichostatin A in pancreatic cancer cells." *World J Gastroenterol* 16(16): 1970-8.
- Esteller, M. (2006). "The necessity of a human epigenome project." *Carcinogenesis* 27(6): 1121-5.
- Everhart, J. and D. Wright (1995). "Diabetes mellitus as a risk factor for pancreatic cancer. A meta-analysis." *JAMA* 273(20): 1605-9.
- Freelove, R. and A. D. Walling (2006). "Pancreatic cancer: diagnosis and management." *Am Fam Physician* 73(3): 485-92.
- Fritscher-Ravens, A., J. R. Izbicki, et al. (2000). "Endosonography-guided, fine-needle aspiration cytology extending the indication for organ-preserving pancreatic surgery." *Am J Gastroenterol* 95(9): 2255-60.

- Gahr, S., M. Ocker, et al. (2007). "The combination of the histone-deacetylase inhibitor trichostatin A and gemcitabine induces inhibition of proliferation and increased apoptosis in pancreatic carcinoma cells." *Int J Oncol* 31(3): 567-76.
- Garcia-Morales, P., A. Gomez-Martinez, et al. (2005). "Histone deacetylase inhibitors induced caspase-independent apoptosis in human pancreatic adenocarcinoma cell lines." *Mol Cancer Ther* 4(8): 1222-30.
- Gimsing, P., M. Hansen, et al. (2008). "A phase I clinical trial of the histone deacetylase inhibitor belinostat in patients with advanced hematological neoplasia." *Eur J Haematol* 81(3): 170-6.
- Glaser, K. B., M. J. Staver, et al. (2003). "Gene expression profiling of multiple histone deacetylase (HDAC) inhibitors: defining a common gene set produced by HDAC inhibition in T24 and MDA carcinoma cell lines." *Mol Cancer Ther* 2(2): 151-63.
- Glimelius, B., K. Hoffman, et al. (1996). "Chemotherapy improves survival and quality of life in advanced pancreatic and biliary cancer." *Ann Oncol* 7(6): 593-600.
- Gold, E. B. and S. B. Goldin (1998). "Epidemiology of and risk factors for pancreatic cancer." *Surg Oncol Clin N Am* 7(1): 67-91.
- Gregory, P. D., K. Wagner, et al. (2001). "Histone acetylation and chromatin remodeling." *Exp Cell Res* 265(2): 195-202.
- Grenacher, L. and M. Klaus (2009). "[Computed tomography of pancreatic tumors]." *Radiologe* 49(2): 107-23.
- Grozinger, C. M. and S. L. Schreiber (2002). "Deacetylase enzymes: biological functions and the use of small-molecule inhibitors." *Chem Biol* 9(1): 3-16.
- Gudjonsson, B. (1987). "Cancer of the pancreas. 50 years of surgery." *Cancer* 60(9): 2284-303.
- Gustin, A., L. Pederson, et al. (2002). "Application of molecular biology studies to gene therapy treatment strategies." *World J Surg* 26(7): 854-60.
- Haag, C. and G. Ehninger (2002). "[Indications for chemotherapy in cancers of the esophagus, stomach and pancreas]." *Z Gastroenterol* 40 Suppl 1: S68-S70.
- Hahn, S. A. and W. H. Schmiegel (1998). "Recent discoveries in cancer genetics of exocrine pancreatic neoplasia." *Digestion* 59(5): 493-501.
- Hartwig, W., L. Schneider, et al. (2009). "Preoperative tissue diagnosis for tumours of the pancreas." *Br J Surg* 96(1): 5-20.
- Hedberg, M., A. Borgstrom, et al. (1998). "Survival following pancreatic carcinoma: a follow-up study of all cases recorded in Malmo, Sweden, 1977-1991." *Br J Surg* 85(12): 1641-4.
- Heinemann, V. (2001). "Gemcitabine: progress in the treatment of pancreatic cancer." *Oncology* 60(1): 8-18.

- Howard, J. M. and G. L. Jordan, Jr. (1977). "Cancer of the pancreas." Curr Probl Cancer 2(3): 5-52.
- Hruban, R. H., N. V. Adsay, et al. (2001). "Pancreatic intraepithelial neoplasia: a new nomenclature and classification system for pancreatic duct lesions." Am J Surg Pathol 25(5): 579-86.
- Hruban, R. H., M. Goggins, et al. (2000). "Progression model for pancreatic cancer." Clin Cancer Res 6(8): 2969-72.
- Jemal, A., R. Siegel, et al. (2010). "Cancer statistics, 2010." CA Cancer J Clin 60(5): 277-300.
- Jenuwein, T. and C. D. Allis (2001). "Translating the histone code." Science 293(5532): 1074-80.
- Johnstone, R. W. (2002). "Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer." Nat Rev Drug Discov 1(4): 287-99.
- Johnstone, R. W. and J. D. Licht (2003). "Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy: is transcription the primary target?" Cancer Cell 4(1): 13-8.
- Kästner, F., Ed. (2004). Crashkurs Innere Medizin, Urban & Fischer.
- Kelly, W. K. and P. A. Marks (2005). "Drug insight: Histone deacetylase inhibitors-- development of the new targeted anticancer agent suberoylanilide hydroxamic acid." Nat Clin Pract Oncol 2(3): 150-7.
- Kern, S. E. (1998). "Advances from genetic clues in pancreatic cancer." Curr Opin Oncol 10(1): 74-80.
- Khan, N., M. Jeffers, et al. (2008). "Determination of the class and isoform selectivity of small-molecule histone deacetylase inhibitors." Biochem J 409(2): 581-9.
- Kim, J. C., D. D. Kim, et al. (2009). "Evaluation of novel histone deacetylase inhibitors as therapeutic agents for colorectal adenocarcinomas compared to established regimens with the histoculture drug response assay." Int J Colorectal Dis 24(2): 209-18.
- Kim, M. S., H. J. Kwon, et al. (2001). "Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes." Nat Med 7(4): 437-43.
- Kornberg, R. D. and Y. Lorch (1999). "Chromatin-modifying and -remodeling complexes." Curr Opin Genet Dev 9(2): 148-51.
- Krebsgesellschaft, D. (2009). "S3 Leitlinie: Exokrines Pankreaskarzinom."
- Krebsregister, G. d. e. K. i. D. e. V. (2006). *Krebs in Deutschland: Häufigkeiten und Trends*

- Kumagai, T., N. Wakimoto, et al. (2007). "Histone deacetylase inhibitor, suberoylanilide hydroxamic acid (Vorinostat, SAHA) profoundly inhibits the growth of human pancreatic cancer cells." Int J Cancer 121(3): 656-65.
- Künzli, B., Friess, H., Kleeff, J., Yekebas, E., Mann, O., Izbicki, JR., Büchler, MW. (2004). "Kurativoperative Therapie des Pankreaskarzinoms." Onkologe 10: 1285-1300.
- Landis, S. H., T. Murray, et al. (1999). "Cancer statistics, 1999." CA Cancer J Clin 49(1): 8-31, 1.
- Lassen, U., L. R. Molife, et al. (2010). "A phase I study of the safety and pharmacokinetics of the histone deacetylase inhibitor belinostat administered in combination with carboplatin and/or paclitaxel in patients with solid tumours." Br J Cancer 103(1): 12-7.
- Lilly (2004). Gemzar® Zusammenfassung der Produktmerkmale und Fachinformation, Lilly Deutschland GmbH.
- Lindemann, R. K., B. Gabrielli, et al. (2004). "Histone-deacetylase inhibitors for the treatment of cancer." Cell Cycle 3(6): 779-88.
- Linskens, R. K., R. P. Golding, et al. (2000). "Severe acute lung injury induced by gemcitabine." Neth J Med 56(6): 232-5.
- Lionetto, R., V. Pugliese, et al. (1995). "No standard treatment is available for advanced pancreatic cancer." Eur J Cancer 31A(6): 882-7.
- Liu, P. Y., J. Y. Chan, et al. (2008). "Modulation of the cyclin-dependent kinase inhibitor p21(WAF1/Cip1) gene by Zac1 through the antagonistic regulators p53 and histone deacetylase 1 in HeLa Cells." Mol Cancer Res 6(7): 1204-14.
- Löhr, J. M., Heinemann, V., Friess, H., Ed. (2008). Pankreaskarzinom. Bremen, Uni-Med Verlag.
- Loos, M., H. Friess, et al. (2009). "Surgery of malignant pancreatic tumors." Radiologe 49(2): 137-43.
- Ma, B. B., F. Sung, et al. (2008). "The preclinical activity of the histone deacetylase inhibitor PXD101 (belinostat) in hepatocellular carcinoma cell lines." Invest New Drugs 28(2): 107-14.
- Mackay, H. J., H. Hirte, et al. (2008). "Phase II trial of the histone deacetylase inhibitor belinostat in women with platinum resistant epithelial ovarian cancer and micropapillary (LMP) ovarian tumours." Eur J Cancer 46(9): 1573-9.
- Maeda, T., M. Towatari, et al. (2000). "Up-regulation of costimulatory/adhesion molecules by histone deacetylase inhibitors in acute myeloid leukemia cells." Blood 96(12): 3847-56.
- Magner, W. J., A. L. Kazim, et al. (2000). "Activation of MHC class I, II, and CD40 gene expression by histone deacetylase inhibitors." J Immunol 165(12): 7017-24.

- Mahlknecht, U. (2002). *Charakterisierung, Funktion und pathogenetische Bedeutung von Histone-Deacetylasen. Habilitationsschrift. Frankfurt am Main, Fachbereich Innere Medizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität. 1-9.*
- Manabe, T. and T. Tobe (1989). "Progress in the diagnosis and treatment of pancreatic cancer--the Kyoto University experience." *Hepatogastroenterology* 36(6): 431-6.
- Marks, P., R. A. Rifkind, et al. (2001). "Histone deacetylases and cancer: causes and therapies." *Nat Rev Cancer* 1(3): 194-202.
- Marks, P. A., V. M. Richon, et al. (2004). "Histone deacetylase inhibitors: development as cancer therapy." *Novartis Found Symp* 259: 269-81; discussion 281-8.
- Marks, P. A., V. M. Richon, et al. (2004). "Histone deacetylase inhibitors." *Adv Cancer Res* 91: 137-68.
- Marks, P. A., V. M. Richon, et al. (2000). "Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells." *J Natl Cancer Inst* 92(15): 1210-6.
- Marmorstein, R. and S. Y. Roth (2001). "Histone acetyltransferases: function, structure, and catalysis." *Curr Opin Genet Dev* 11(2): 155-61.
- Marquard, L., K. D. Petersen, et al. (2008). "Monitoring the effect of belinostat in solid tumors by H4 acetylation." *APMIS* 116(5): 382-92.
- Martin, A. P., M. A. Park, et al. (2009). "BCL-2 family inhibitors enhance histone deacetylase inhibitor and sorafenib lethality via autophagy and overcome blockade of the extrinsic pathway to facilitate killing." *Mol Pharmacol* 76(2): 327-41.
- Moore, P. S., S. Barbi, et al. (2004). "Gene expression profiling after treatment with the histone deacetylase inhibitor trichostatin A reveals altered expression of both pro- and anti-apoptotic genes in pancreatic adenocarcinoma cells." *Biochim Biophys Acta* 1693(3): 167-76.
- Mosmann, T. (1983). "Rapid colorimetric assay for cellular growth and survival: application to proliferation and cytotoxicity assays." *J Immunol Methods* 65(1-2): 55-63.
- Neoptolemos, J. P., D. D. Stocken, et al. (2010). "Adjuvant chemotherapy with fluorouracil plus folinic acid vs gemcitabine following pancreatic cancer resection: a randomized controlled trial." *JAMA* 304(10): 1073-81.
- Neoptolemos, J. P., D. D. Stocken, et al. (2004). "A randomized trial of chemoradiotherapy and chemotherapy after resection of pancreatic cancer." *N Engl J Med* 350(12): 1200-10.
- Neoptolemos, J. P., D. D. Stocken, et al. (2009). "Adjuvant 5-fluorouracil and folinic acid vs observation for pancreatic cancer: composite data from the ESPAC-1 and -3(v1) trials." *Br J Cancer* 100(2): 246-50.

- Oettle, H., D. Arnold, et al. (2000). "The role of gemcitabine alone and in combination in the treatment of pancreatic cancer." Anticancer Drugs 11(10): 771-86.
- Oettle, H., S. Post, et al. (2007). "Adjuvant chemotherapy with gemcitabine vs observation in patients undergoing curative-intent resection of pancreatic cancer: a randomized controlled trial." JAMA 297(3): 267-77.
- Ottmann, O. G. (2002). *Signaltransduktionsmodulatoren - Neue Substanzen zur Therapie von Leukämien*. Frankfurt am Main, Universität. 4, 1-6.
- Paoluzzi, L., L. Scotto, et al. (2010). "Romidepsin and belinostat synergize the antineoplastic effect of bortezomib in mantle cell lymphoma." Clin Cancer Res 16(2): 554-65.
- Peart, M. J., G. K. Smyth, et al. (2005). "Identification and functional significance of genes regulated by structurally different histone deacetylase inhibitors." Proc Natl Acad Sci U S A 102(10): 3697-702.
- Piacentini, P., M. Donadelli, et al. (2006). "Trichostatin A enhances the response of chemotherapeutic agents in inhibiting pancreatic cancer cell proliferation." Virchows Arch 448(6): 797-804.
- Plumb, J. A., P. W. Finn, et al. (2003). "Pharmacodynamic response and inhibition of growth of human tumor xenografts by the novel histone deacetylase inhibitor PXD101." Mol Cancer Ther 2(8): 721-8.
- Plunkett, W., P. Huang, et al. (1995). "Preclinical characteristics of gemcitabine." Anticancer Drugs 6 Suppl 6: 7-13.
- Plunkett, W., P. Huang, et al. (1995). "Gemcitabine: metabolism, mechanisms of action, and self-potential." Semin Oncol 22(4 Suppl 11): 3-10.
- Prince, H. M., M. J. Bishton, et al. (2009). "Clinical studies of histone deacetylase inhibitors." Clin Cancer Res 15(12): 3958-69.
- Qian, X., G. Ara, et al. (2008). "Activity of the histone deacetylase inhibitor belinostat (PXD101) in preclinical models of prostate cancer." Int J Cancer 122(6): 1400-10.
- Qian, X., W. J. LaRochelle, et al. (2006). "Activity of PXD101, a histone deacetylase inhibitor, in preclinical ovarian cancer studies." Mol Cancer Ther 5(8): 2086-95.
- Raimondi, S., P. Maisonneuve, et al. (2007). "Early onset pancreatic cancer: evidence of a major role for smoking and genetic factors." Cancer Epidemiol Biomarkers Prev 16(9): 1894-7.
- Reik, W. (2007). "Stability and flexibility of epigenetic gene regulation in mammalian development." Nature 447(7143): 425-32.
- Remmele, W., Ed. (1997). Pathologie. Berlin, Springer.
- Resor, L., T. J. Bowen, et al. (2001). "Unraveling human cancer in the mouse: recent refinements to modeling and analysis." Hum Mol Genet 10(7): 669-75.

- Richon, V. M., T. W. Sandhoff, et al. (2000). "Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation." Proc Natl Acad Sci U S A 97(18): 10014-9.*
- River, C. (2009). Datasheet CD-1 Nude Mouse.*
- Rothenberg, M. L., J. L. Abbruzzese, et al. (1996). "A rationale for expanding the endpoints for clinical trials in advanced pancreatic carcinoma." Cancer 78(3 Suppl): 627-32.*
- Schiebler, T. H., Schmidt, W., Ed. (2004). Anatomie. Berlin, Heidelberg, New York, Springer*
- Schmidt, T., Lang, Ed. (2002). Physiologie des Menschen. Berlin, Heidelberg, New York, Springer-Verlag.*
- Schmoll, H. J., T. Buchele, et al. (1999). "Where do we stand with 5-fluorouracil?" Semin Oncol 26(6): 589-605.*
- Scholzen, T. and J. Gerdes (2000). "The Ki-67 protein: from the known and the unknown." J Cell Physiol 182(3): 311-22.*
- Schrump, D. S. (2009). "Cytotoxicity mediated by histone deacetylase inhibitors in cancer cells: mechanisms and potential clinical implications." Clin Cancer Res 15(12): 3947-57.*
- Silverman, D. T. (2001). "Risk factors for pancreatic cancer: a case-control study based on direct interviews." Teratog Carcinog Mutagen 21(1): 7-25.*
- Stapnes, C., A. Rynningen, et al. (2007). "Functional characteristics and gene expression profiles of primary acute myeloid leukaemia cells identify patient subgroups that differ in susceptibility to histone deacetylase inhibitors." Int J Oncol 31(6): 1529-38.*
- Stathis, A. and M. J. Moore (2010). "Advanced pancreatic carcinoma: current treatment and future challenges." Nat Rev Clin Oncol 7(3): 163-72.*
- Steele, N., P. Finn, et al. (2009). "Combined inhibition of DNA methylation and histone acetylation enhances gene re-expression and drug sensitivity in vivo." Br J Cancer 100(5): 758-63.*
- Steele, N. L., J. A. Plumb, et al. (2010). "Pharmacokinetic and pharmacodynamic properties of an oral formulation of the histone deacetylase inhibitor Belinostat (PXD101)." Cancer Chemother Pharmacol.*
- Steele, N. L., J. A. Plumb, et al. (2008). "A phase 1 pharmacokinetic and pharmacodynamic study of the histone deacetylase inhibitor belinostat in patients with advanced solid tumors." Clin Cancer Res 14(3): 804-10.*
- Strahl, B. D. and C. D. Allis (2000). "The language of covalent histone modifications." Nature 403(6765): 41-5.*

- Strickler, H. D., J. Wylie-Rosett, et al. (2001). "The relation of type 2 diabetes and cancer." Diabetes Technol Ther 3(2): 263-74.*
- Tersmette, A. C., G. M. Petersen, et al. (2001). "Increased risk of incident pancreatic cancer among first-degree relatives of patients with familial pancreatic cancer." Clin Cancer Res 7(3): 738-44.*
- Theocharis, S., G. Kouraklis, et al. (2003). "Glucocorticoid receptor (GR) immunohistochemical expression is correlated with cell cycle-related molecules in human colon cancer." Dig Dis Sci 48(9): 1745-50.*
- TopoTarget (2009). Belinostat - Material Safety Data Sheet TopoTarget.*
- Towbin, H., T. Staehelin, et al. (1979). "Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications." Proc Natl Acad Sci U S A 76(9): 4350-4.*
- Tumber, A., L. S. Collins, et al. (2007). "The histone deacetylase inhibitor PXD101 synergises with 5-fluorouracil to inhibit colon cancer cell growth in vitro and in vivo." Cancer Chemother Pharmacol 60(2): 275-83.*
- UICC (2010). Classification of malignant tumors. Union International Contre Cancer.*
- Van Lint, C., S. Emiliani, et al. (1996). "The expression of a small fraction of cellular genes is changed in response to histone hyperacetylation." Gene Expr 5(4-5): 245-53.*
- Vigushin, D. M., S. Ali, et al. (2001). "Trichostatin A is a histone deacetylase inhibitor with potent antitumor activity against breast cancer in vivo." Clin Cancer Res 7(4): 971-6.*
- Wagner, M., C. Redaelli, et al. (2004). "Curative resection is the single most important factor determining outcome in patients with pancreatic adenocarcinoma." Br J Surg 91(5): 586-94.*
- Wanebo, H. J. and M. P. Vezeridis (1996). "Pancreatic carcinoma in perspective. A continuing challenge." Cancer 78(3 Suppl): 580-91.*
- Warshaw, A. L. and C. Fernandez-del Castillo (1992). "Pancreatic carcinoma." N Engl J Med 326(7): 455-65.*
- Welsch, T., J. Kleeff, et al. (2007). "Molecular pathogenesis of pancreatic cancer: advances and challenges." Curr Mol Med 7(5): 504-21.*
- Westphal, S. and H. Kalthoff (2003). "Apoptosis: targets in pancreatic cancer." Mol Cancer 2: 6.*
- Wu, X. and P. P. Pandolfi (2001). "Mouse models for multistep tumorigenesis." Trends Cell Biol 11(11): S2-9.*

8 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Entwicklungsmodell des Pankreaskarzinoms	5
Abbildung 2: Strukturformel Gemcitabine	8
Abbildung 3: Struktur eines Nukleosoms	10
Abbildung 4: Strukturformel Belinostat.....	16
Abbildung 5: Umwandlung von MTT zu Formazan.....	28
Abbildung 6: Dot-blot.....	31
Abbildung 7: Beispiele für Dot-blot-Diagramme unbehandelter Zellen	31
Abbildung 8: Subkutane Injektion der Pankreaskarzinomzellen	37
Abbildung 9: Zellproliferation von T3M4-, ASPC- und Panc-1-Zellen.....	41
Abbildung 10:FACS-Analyse T3M4-Zellen.....	43
Abbildung 11: FACS-Analyse ASPC-Zellen.....	44
Abbildung 12: Favs-Analyse Panc-1-Zellen	45
Abbildung 13: Graphische Darstellung der Apoptoserate -aufgeteilt in Früh- und Spätapoptose sowie Nekrose.....	46
Abbildung 14: Apoptoserate (Früh- und Spätapoptose zusammengefasst).	47
Abbildung 15: Western Blot der Acetylierung von Histonen	49
Abbildung 16: Expression von p21 nach der Behandlung mit Belinostat	50
Abbildung 17: Subkutaner Tumor im Mausmodell, 28 Tage nach Zellinjektion	51
Abbildung 18: Pankreastumor im Mausmodell, 28 Tage nach Zellinjektion	51
Abbildung 19: Tumorgröße subkutan	52
Abbildung 20: Tumorgröße Pankreas	53
Abbildung 21: Schnitt der Tumore nach Färbung mit KI-67, 400-fache Vergrößerung	55
Abbildung 22: Quantifizierung der proliferierenden Zellen nach KI-67 Färbung.....	55

9 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Behandlungsschema der Tumorzelllinien mit Belinostat für den MTT-Assay	29
Tabelle 2: Behandlungsschema der drei Zelllinien für den Apoptoseassay.....	30

10 Abkürzungsverzeichnis

Bel	Belinostat
Cdk	Zyclin-abhängige Kinase (<i>Cyclin dependent kinase</i>)
cDNA	Komplementär DNA
DMEM	Dulbecco`s Modified Eagle`s Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
ECL	Enhanced Chemoluminescence
EGF(R)	Epidermaler Wachstumsfaktor(rezeptor) (<i>Epidermal growth factor (receptor)</i>)
ELISA	Enzyme linked immunosorbent assay
FACS	Durchflusszytometrie (<i>Fluorescence activated cell sorter</i>)
Fas	Rezeptor der TNF-Familie
G1/G2-Phase	Phasen der Mitose
GAPDH	Glycerinaldehyd-3-phosphat-dehydrogenase
Gem	Gemcitabine
H	Histon
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondeacetylase
HDACi	Histondeacetylaseinhibitor
IBF	Interfakultäre Biomedizinische Forschungseinrichtung
i.p.	Intraperitoneal
IC50	Proteinkonzentration, die die Viabilität der behandelten Zellen auf 50% im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen senkt
Ig	Immunglobulin
IGF	Insulin-ähnlicher Wachstumsfaktor (<i>Insulin like growth factor</i>)
K	unbehandelte Kontrolle
MOPS	3-Morpholino-propan-sulfonsäure
MTT	3-(4,5-Dimethyl-2-thiazolyl)-2,5-diphenyl-2H-tetrazoliumbromid
NaCl	Natriumchlorid
p21	Protein 21
PBS	Phosphat-gepufferte Lösung (<i>Phosphate buffered saline</i>)

Abkürzungsverzeichnis

PDAC	Duktales Adenokarzinom des Pankreas (<i>Pancreatic ductal adenocarcinoma</i>)
PI	Propidiumiodid
PS	Phosphatidylserin
RIPA	Radio immunoprecipitation assay
RNA	Ribonukleinsäure
rpm	Umdrehungen pro Minute (<i>Rounds per minute</i>)
RT	Raumtemperatur
S.E.	Standardabweichung (<i>Standard error</i>)
SAHA	Suberoylanilide hydroxamic acid
sc	Subkutan
SDS-PAGE	Natriumdodecylsulfat-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (<i>Sodiumdodecylsulfate gelelectrophoresis</i>)
SEM	Standardfehler des Mittelwerts (<i>Standard error of the mean</i>)
TBS	Tris-gepufferte isotonische NaCl Lösung (<i>Tris buffered saline</i>)
TBS-T	Tris-gepufferte isotonische NaCl-Lösung plus Tween-20
TGF	Transforming growth factor
TNF	Tumor Nekrose Faktor
TRAIL	TNF-verbundener Apoptose-indizierender Ligand (<i>TNF-related apoptosis-inducing ligand</i>)
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-Aminomethan
TSA	Trichostatin A
T-Zellen	Thymus-abhängige Lymphozyten
VEGF(R)	Vaskulärer endothelialer Wachstumsfaktor(rezeptor) (<i>Vascular endothelial growth factor (receptor)</i>)

11 Danksagung

Mein aufrichtiger Dank gilt allen Personen, die zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

Insbesondere möchte ich danken:

Herrn Prof. Dr. med. vet. Andreas Moritz für sein Interesse an meiner Arbeit und die Vertretung im Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen.

Herrn Prof. Dr. Jens Werner für die Überlassung des interessanten Themas, die Aufnahme in seine Arbeitsgruppe sowie die hilfreichen Anregungen bei der Korrektur meiner Arbeit.

Herrn Dr. Dmitriy Dovzhanskiy für die gute Betreuung, Engagement, Hilfsbereitschaft und ein stets offenes Ohr für alle Fragen.

Frau Dr. Natalia Giese und Herrn Dr. Klaus Felix für die wertvollen Hinweise und kritischen Anmerkungen zu praktischen und theoretischen Aspekten dieser Arbeit.

Frau Dr. Anette Heller für ihre positive Einstellung und aufbauenden Ratschläge.

Bruni Bentzinger, Esther Soyka, Karin Ruf und Nigora Dadabaeva für die gute Einweisung in die verschiedenen wissenschaftlichen Methoden und ihre konstruktive Begleitung im Laboralltag.

Allen weiteren Mitarbeitern des Europäischen Pankreaszentrums für die herzliche Aufnahme und das angenehme Arbeitsklima.

Herrn Prof. Dr. Olaf Witt und seiner Arbeitsgruppe im DKFZ, vor allem Frau Dr. Ina Oehme und Cornelia Rütz, für die Bereitstellung ihrer Materialien und die Hilfe bei der Durchführung der Western Blots.

Dieter Stefan aus dem Institut für Immunologie der Universität Heidelberg für die ausgezeichnete technische Unterstützung bei der Durchführung der FACS-Analyse.

Den Tierpflegern der Interdisziplinären Biomedizinischen Forschungseinrichtung für die verantwortungsvolle und zuverlässige Versorgung meiner Mäuse.

Meinen Eltern für die Ermöglichung des Studiums und der Erstellung dieser Dissertation, ihren steten Glauben an mich, ihre wertvolle und uneingeschränkte Unterstützung bei der Verfolgung all meiner Ziele und die Hilfe bei der Korrektur dieser Arbeit.

Jared danke ich dafür, dass es ihn gibt.

12 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.“