

**Einfluss von Histondeacetylaseinhibitoren
auf die neuronale Differenzierung
von neuroendokrin differenzierten Tumorzellen**

Inauguraldissertation

zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin

des Fachbereichs Medizin

der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Janina Anette Mathies

aus Hamburg

Gießen, 2011

Aus dem Zentrum für Neurologie und Neurochirurgie
Klinik für Neurologie
Leiter: Prof. Dr. med. M. Kaps
der Universitätsklinikum Giessen und Marburg GmbH
Standort Giessen

Gutachter: Prof. Dr. med. F. Blaes
Gutachter: Prof. Dr. med. U. Lange

Tag der Disputation: 23.04.2012

INHALTSVERZEICHNIS

Zusammenfassung	1
Summary	3
1 Einleitung	5
1.1 Neuronale Differenzierung	5
1.2 Histondeacetylaseinhibitoren	7
1.3 Neuroblastome	12
1.4 Bronchialkarzinome als neuroendokrin differenzierte Tumore	14
1.5 Fragestellung	18
2 Material und Methoden	19
2.1 Material	19
2.2 Zellkultur	21
2.2.1 Zellkultur der etablierten Zelllinien	21
2.2.2 Primärkultur Auerbach-Plexus	21
2.3 Durchflusszytometrie (FACS)	25
2.3.1 Protokoll für extrazelluläre Färbung	28
2.3.2 Protokoll für intrazelluläre Färbung	29
3 Statistik	30
4 Resultate	31
4.1 basale Expression	31
4.1.1 basale Expression neuronaler Proteine	32
4.1.2 basale Expression nicht-neuronaler Proteine	37
4.2 Expressionsänderung unter der Stimulation mit Valproinsäure	41
4.2.1 Expressionsänderung neuronaler Proteine unter der Stimulation mit Valproinsäure	41
4.2.2 Expressionsänderung nicht-neuronaler Proteine unter der Stimulation mit Valproinsäure	46

4.3	Proteinexpressionsänderung der Neuroblastomzelllinien SKN-SH und SH-SY5Y unter der Stimulation mit Trichostatin A im Vergleich zu der Stimulation mit Valproinsäure	50
4.3.1	Vergleich der Expressionsänderung neuronaler Proteine	51
4.3.2	Vergleich der Expressionsänderung nicht-neuronaler Proteine	53
4.4	Expressionsänderung von RT1-A nach Stimulation mit Valproinsäure in der Primärkultur Plexus Auerbach-Neurone	55
5	Diskussion	56
5.1	Methodendiskussion	56
5.1.1	Wahl des Analyseverfahrens	56
5.1.2	Vergleichbarkeit von Valproinsäure und Trichostatin A	56
5.1.3	Heterogenität der Zelllinien	57
5.2	Wirkung von Histondeacetylaseinhibitoren auf die Proteinexpression	58
5.2.1	Einfluss des Histondeacetylaseinhibitors Valproinsäure auf die Expression neuronaler Proteine	59
5.2.2	Einfluss des Histondeacetylaseinhibitors Valproinsäure auf die Expression nicht-neuronaler Proteine	62
5.3	Einfluss des Histondeacetylaseinhibitors TSA auf die Proteinexpression	67
5.3.1	Einfluss des Histondeacetylaseinhibitors TSA auf die Expression neuronaler Proteine	67
5.3.2	Einfluss des Histondeacetylaseinhibitors TSA auf die Expression nicht-neuronaler Proteine	68
5.4	Klinischer Nutzen der Histondeacetylaseinhibitoren	69
6	Abbildungsverzeichnis	72
7	Tabellenverzeichnis	75
8	Abkürzungsverzeichnis	76
9	Literaturverzeichnis	78
10	Anhang	86
11	Publikationsverzeichnis	86
12	Danksagung	87

Zusammenfassung

Hintergrund: Kanzerogenese entsteht durch fehlerhafte Genexpression. Diese ist unter anderem gekennzeichnet durch eine fehlende Differenzierung, unkontrollierte Zellproliferation und gestörte Apoptose. Die pharmakologische Differenzierungstherapie stellt einen neuen Ansatz in der Tumorthherapie dar. Die fehlerhafte Genexpression wird durch das Eingreifen in die Regulationsmechanismen der Transkription verändert, wodurch eine Änderung des malignen Phänotyps der Zelle erreicht werden soll. Acetylierung und Deacetylierung von Histonen stellen einen hierbei verwendeten Regulationsmechanismus dar.

Methodik: Ziel der vorliegenden Arbeit war die Untersuchung der Wirkung des Histondeacetylase-Inhibitors (HDAC-Inhibitor) Valproinsäure (VPA) auf die Proteinexpression neuroendokriner Tumorzelllinien. Hierzu wurde VPA in einer Konzentration von 1mMol 48 Stunden zu der Zellkultur dreier Neuroblastomzelllinien und dreier neuroendokrin differenzierter Bronchialkarzinomzelllinien hinzugegeben. Anschließend wurden die Zellen mittels Durchflusszytometrie auf die Änderung der Expression der extrazellulären Proteine NCAM, p75, MHC-Klasse I und MHC-Klasse II und der intrazellulär exprimierten Proteine HuD, Neurofilamentprotein, Synaptotagmin und bcl-2 untersucht. Ergänzend erfolgte die Untersuchung auf RT1-A-Expressionsänderungen in der Primärkultur von *Plexus myentericus*.

Ergebnisse: HDAC-Inhibitoren weisen eine Tumorzelllinien-spezifische Wirkweise auf. Die Neuroblastomzelllinien SKN-SH und SH-SY5Y sowie die Bronchialkarzinomzelllinien H460 und A549 erreichten durch die Stimulation mit VPA einen niedrigeren neuronalen Differenzierungsgrad, wohingegen die Bronchialkarzinomzelllinie A510 VPA-induziert neuronal ausdifferenzierten. Im Gegensatz zu der für Trichostatin A (TSA), einem bereits sehr gut charakterisierten HDAC-Inhibitor, bisher postulierten, spezifisch neuronalen, antiapoptotischen Wirkung wiesen die Neuroblastomzelllinien einheitlich durch die Stimulation mit VPA ein Proteinexpressionsmuster zur Apoptoseeinleitung auf. Des Weiteren konnte eine Hochregulation des MCH-Klasse-I- und II-Komplexes nachgewiesen werden. Die Induktion des MHC Klasse I- und II-Komplexes wurde bisher zwar schon unter TSA beschrieben, konnte nun aber durch die VPA-Behandlung erstmalig in dieser Form so deutlich gezeigt werden.

Schlussfolgerung: Wie bereits durch andere Arbeitsgruppen beschrieben, konnte die Einleitung einer Apoptose und eine Differenzierungsinduktion durch die VPA-Behandlung nachgewiesen werden. Die Induktion der MHC Klasse I- und II-Expression wurde in der vorliegenden Arbeit erstmalig in dieser Form nachgewiesen. Dieser Effekt erhöht die Immunogeni-

tät neuronaler Tumore, da sich insbesondere diese der immunologischen Erkennung entziehen. Da VPA bei den Neuroblastom- und Bronchialkarzinomzelllinien zu einer Erhöhung der Apoptoserate führt, könnten diese Ergebnisse für Kombinationstherapien mit VPA und neueren immunmodulierenden Therapien von besonderer Bedeutung sein.

Summary

Background: Cancer genesis is caused by defective gene expression. This process is characterized by lack of differentiation, uncontrolled cell proliferation and malfunctioning apoptosis. The pharmacological induction of differentiation is a recent approach on the treatment of neoplasms. By interfering into the regulation of transcription, the correct gene expression should be reconstituted, whereby the malignant phenotype shifts into a less malignant type of cells. Acetylation and deacetylation of histone proteins are two of these mechanisms of regulation.

Method: In this work we examined the effects of the histone deacetylase inhibitor (HDAC-inhibitors) valproic acid (VPA) on protein expression in neuroendocrine differentiated malignant cell lines. To achieve this target we incubated three neuroblastoma cell lines and three neuroendocrine differentiated lung carcinoma cell lines with VPA in a concentration of 1mMol for 48 hours. Afterwards we detected the alteration of the expression of the extracellular proteins NCAM, p75, MHC class I and MHC class II, as well as the intracellular expressed proteins HuD, Neurofilament protein, Synaptotagmin and bcl-2 by using the flow cytometry. Additionally the change of expression of RT1-A in the primary culture of plexus myentericus cells from rats was detected.

Results: HDAC-inhibitors show a tumor cell line-specific effect. The neuroblastoma cell lines SKN-SH and SH-SY5Y, as well as the lung carcinoma cell lines H460 and A549 achieved a lower grad of differentiation by the stimulation with VPA. In contrast the lung cancer cell line A 510 differentiated neuronal. For Trichostatin A (TSA), a very well characterized HDAC-inhibitor a specific neuronal antiapoptotic effect is approved. But in contrary to the expectations the neuroblastoma cell lines consistently possessed a pattern of expression, which is attributed to apoptosis. Additionally it could be verified, that the expression of MHC class I and MHC class II was considerably induced. It has already been formerly established, that Trichostatin A (TSA) treatment leads to a higher expression of MHC class I and II. But by the use of VPA, these effects became much clearer.

Conclusion: As already pictured out by other groups, we were able to demonstrate the induction of differentiation and the leading-in of apoptosis by VPA as well. But for the first time we succeeded in demonstrating the clear increase of MHC class I and MHC class II-expression under these conditions. As a consequence of this, the tumor-immunogenicity of these neuronal cancers increases. This is of special interest because the neuroendocrine differentiated tumor cells are in particular able to escape the detection of the immune system. Fur-

thermore VPA is in both, neuroblastoma cell lines and lung carcinoma cell lines, able to induce apoptosis. Due to these facts, these results could play a decisive role in cancer treatment by the development of new immune modulating therapies.

1. Einleitung

1.1 Neuronale Differenzierung

Die Zelldifferenzierung ist entwicklungsgeschichtlich die entscheidende Voraussetzung für mehrzelliges Leben. Ausgehend von der Zygote entwickeln sich unterschiedliche Gewebetypen mit spezifischen Aufgaben. Molekularbiologisch bedeutet dies, dass jeweils nur die für die entsprechenden Gewebe erforderlichen Gene und nicht das komplette Genom transkribiert werden und so die Zelle eine spezifische Aufgabe im komplexen Zusammenspiel erfüllen kann. Differenzierung stellt also eine Form der Genregulation dar.

Neuronale Zellen nehmen eine besondere Rolle in der Differenzierung und Präsentation ihrer Oberflächenproteine ein, da es sich bei zentralen Neuronen in der Regel um postmitotische Zellen handelt, die ihre Fähigkeit zur Zellteilung überwiegend verloren haben. In dieser Arbeit wurden die neuronale Differenzierung und die Differenzierungsänderung von neuroendokrinen Tumorzelllinien bei verschiedenen, ausschließlich neuronalen Proteinen und bestimmten nicht-neuronalen Proteinen ermittelt. Zu diesen neuronalen Proteinen gehören das **Neurofilamentprotein (NF)**, ein Strukturelement neuronaler Zellen, welches mit Mikrotubuli, Aktin und anderen Intermediärfilamenten verknüpft ist und **Synaptotagmin**, ein neuronales präsynaptisches vesikuläres Membranprotein, welches kalziumabhängig für die schnelle Freisetzung von Neurotransmittern zuständig ist. Ebenfalls zu den neuronalen Proteinen gehört das Protein **p-75**, welches als Neurotrophinrezeptor an der Regulation des Zellzyklus und des Zelltodes mitwirkt und der großen Gruppe der Tumornekrosefaktor-Rezeptor-Superfamilie zugeordnet wird. Das Protein p-75 besitzt keine eigene enzymatische Aktivität, sondern ist auf intrazelluläre Interaktoren zur Signaltransduktion angewiesen. Spezifisch neuronal ist auch das hier bestimmte **HuD-Protein**, welches hauptsächlich im Zellkern lokalisiert ist. Des Weiteren wurde die Expression des **neuronalen Zelladhäsionsmoleküls (Neuronal Cell Adhesion Molecule NCAM, CD 56)** gemessen. NCAM ist ein extrazellulär exprimiertes Protein, welches im adulten Nervensystem mit der Regulation der synaptischen Plastizität in Zusammenhang gebracht wird. NCAM ist allerdings kein ausschließlich neuronales Protein, da es unter anderem auch von der Skelettmuskulatur exprimiert wird (Cremer et al. 2000).

Um festzustellen, inwieweit die untersuchten Zellen ihre initiale neuronale Differenzierung aufgaben, wurden typische nicht-neuronale Proteine, wie der **Major-Histokompatibilitäts-Komplex I (engl. Major histocompatibility complex MHC I)** und der **Major-**

Histokompatibilitäts-Komplex II (engl. Major histocompatibility complex MHC II), untersucht. Diese beiden Proteine präsentieren der zellulären Abwehr Antigenbruchstücke an der Zelloberfläche. MHC I präsentiert Peptide aus zytosolischen Proteinen, die in der Zelle selbst synthetisiert worden sind. Sie werden von zytotoxischen T-Zellen erkannt. MHC-II-Moleküle werden von antigenpräsentierenden Zellen, wie Monozyten und Makrophagen, dargeboten. Sie bieten an ihrer Zelloberfläche exogene Antigene an und werden durch CD4-positive T-Zellen erkannt. Zusätzlich wurde **Bcl-2**, ein Protein der Apoptose-Regulierung, untersucht.

1.2 Histondeacetylaseinhibitoren

Die DNA einer Zelle enthält eine sehr große Anzahl an Genen, die für den Aufbau sämtlicher Proteine codieren. Da zu einem gegebenen Zeitpunkt eine Zelle in Abhängigkeit von ihrem Differenzierungszustand und ihrer jeweiligen biologischen Aktivität aber nur spezifische einzelne Proteine benötigt, ergibt sich hieraus, dass nur spezifische DNA-Abschnitte transkribiert und translatiert werden müssen. Sowohl die Transkription als auch die multiplen posttranskriptionalen Prozesse unterliegen jeweils unterschiedlichen Regulationsmechanismen (Löffler & Petrides 1997).

Die DNA eukaryoter Zellen, mit Ausnahme der mitochondrialen DNA, liegt in kondensierter Form als Chromatin im Zellkern vor und assoziiert dort mit den Histonproteinen. Histone werden in fünf Klassen unterteilt: H1, H2A, H2B, H3 und H4. Jeweils vier Nukleosomendimere bilden ein Nukleosomencore (Abb. 1, Abb. 2).

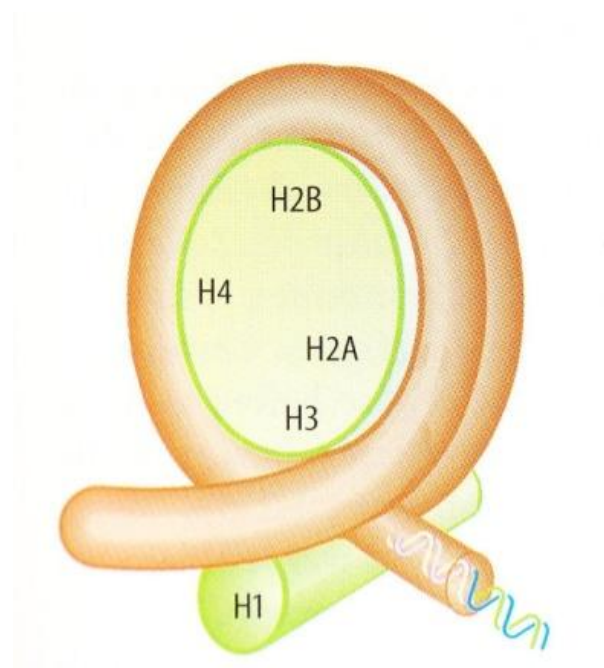


Abb. 1: Nukleosom. Die DNA-Doppelhelix windet sich um octamere Proteinkomplexe aus den Histonen H2A, H2B, H3 und H4. Das Histone H1 ist an ein Zwischenstück gebunden.

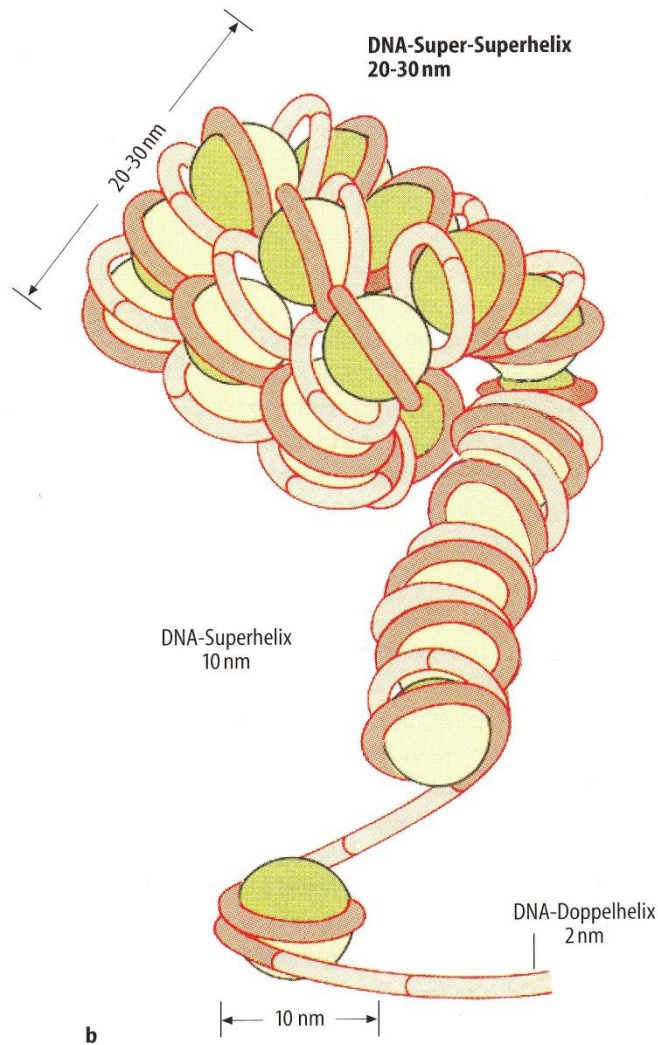


Abb. 2: Schematische Darstellung des DNA-Histon-Komplexes im Chromatin

Damit eine Transkription der Zielgene stattfinden kann, muss das Nukleosom entpackt werden. Dieses Entpacken erfolgt durch die Rekrutierung der Histon-Acetyltransferase (HAT). Durch die Aktivierung der HAT kommt es zu einem Umbau der DNA in eine „offene“ Form, sodass eine Transkription möglich wird. Im Gegensatz dazu führt die Deacetylierung durch Histondeacetylasen (HDACs) zu einer stärker „geschlossenen“ Chromatininformation und damit zu einer verminderten Transkription (Gurvich et al. 2004; Abb. 3).

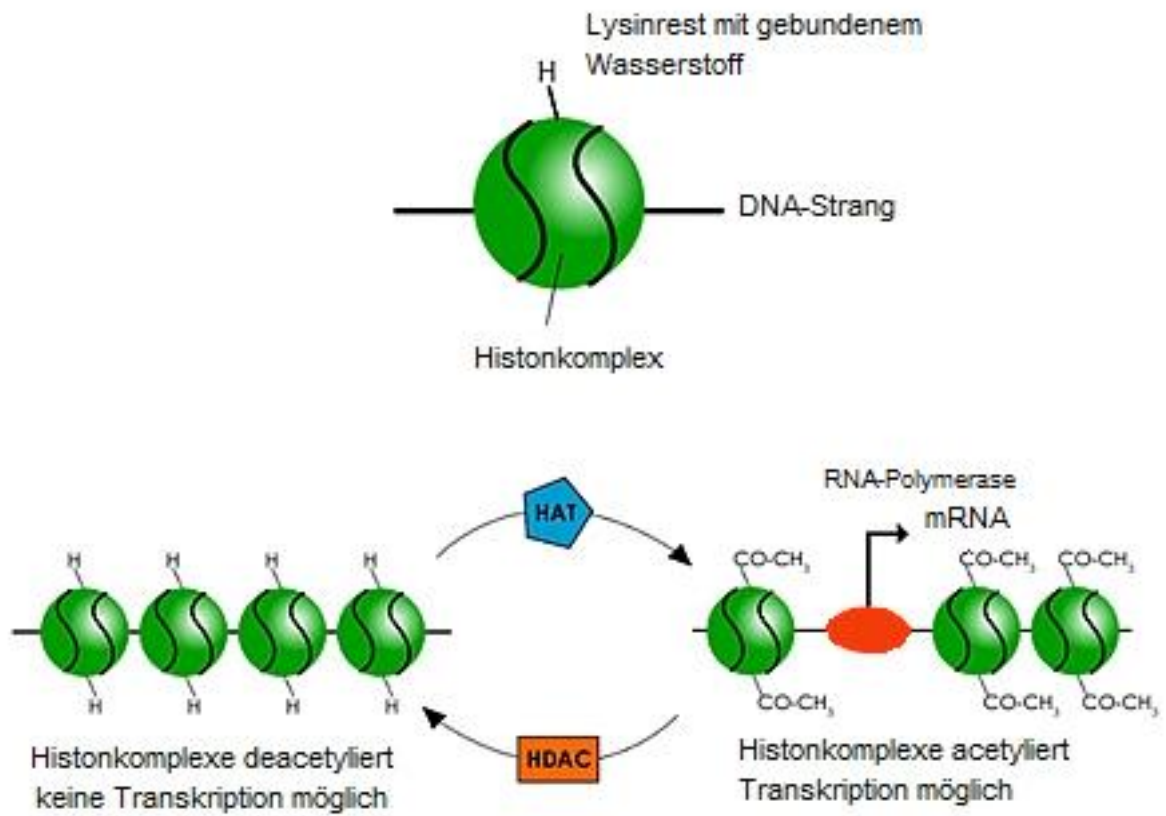


Abb. 3: Regelkreis der Histoneacetylierung und Histondeacetylierung (HAT =Histoneacetyltransferase; HDAC=Histondeacetylase (modifiziert nach Rönndahl 2005))

Die Histondeacetylasen werden in drei Klassen unterteilt, die sich jeweils in weitere Subgruppen gliedern lassen (Tab. 1).

Tab. 1: Einteilung der Histondeacetylasen in Klassen und Subklassen nach Gurvich (Gurvich et al. 2004)

Klasse der HDACs	Charakterisierung der Klasse
Klasse I	Umfasst die HDACs 1-3 und 8. Sie sind homolog zum Hefe-Transkriptionsfaktor RPD3. Häufig bilden die HDACs Komplexe mit Korepressoren. Diese Proteine führen durch die Bindung an Transkriptionsfaktoren zu einer Verminderung der Genexpression.
Klasse II	Umfasst die HDACs 4,5 und 7 (= Subklasse I) sowie 6, 10 und 11 (= Subklasse II): enthält charakteristische NH ₂ -Endsequenzen: kann sich zwischen Nukleus und Zytoplasma bewegen.
Klasse III-Sir2	Unterscheiden sich durch eine deutlich abweichende Aminosäuresequenz und sind im Gegensatz zu den Klassen I und II abhängig von einem Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid. Des Weiteren können sie nicht durch den spezifischen HDAC-Inhibitor Trichostatin A gehemmt werden.

Generell werden Fehlfunktionen der HDACs und der HATs mit onkogenetischen Mechanismen in Verbindung gebracht. Sowohl bei der akuten myeloischen Leukämie (AML) als auch

beim Non-Hodgkin-Lymphom (NHL) kann eine gesteigerte Aktivität der HDAC festgestellt werden (Hildebrand et al. 2001; Huynh & Bardwell 1998).

Durch ihre Fähigkeit zur Transkriptionsmodifikation und Auslösung von Differenzierungsprozessen rücken HDACs und damit auch die HDAC-Inhibitoren in den Fokus der pharmakologischen Tumorthherapie.

HDACs besitzen ein katalytisches Zentrum, welches für die Deacetylierung basischer Aminosäuren nukleosomaler Histone verantwortlich ist (Grundstein 1997). Dieses Zentrum wird durch die HDAC-Inhibitoren kompetitiv gehemmt, was die unterschiedliche Wirksamkeit der verschiedenen HDAC-Inhibitoren erklärt.

Die multiplen HDAC-Inhibitoren zeigen eine unterschiedlich starke Hemmung der verschiedenen HDAC-Klassen, wobei sich die Hemmung sowohl dosisspezifisch als auch über die Zeit verändern kann.

So zeigt zum Beispiel Valproinsäure (VPA) bei 0.7 bis 1 mM eine Hemmung von 50% der Enzymtätigkeit (IC_{50} = Konzentration, die 50% der Enzymaktivität inhibiert) der HDACs 1 bis 3. Bei einer höheren Konzentration von 1 mM bis 1,5 mM zeigt sich eine IC_{50} -Hemmung der HDAC-Klasse II (HDAC 4, 5 und 7 = HDAC-Subklasse I). Bei *in-vivo*-Versuchen an haematopoetischen Leukämie-Zelllinien konnte die Aktivitätsveränderung im Zeitverlauf gezeigt werden. Die Histondeacetylaseaktivität war nach 3 bis 72 Stunden deutlich vermindert, wohingegen die Hemmung durch Trichostatin A mit einer Wirkdauer bis 24 Stunden deutlich kürzer ausfiel (Gurvich et al. 2004).

Neben Valproinsäure und den Valproinsäurederivaten, wie 2-Ethylhexansäure, ist auch Trichostatin A ein wichtiger HDAC-Inhibitor (Abb. 4, Abb. 5).

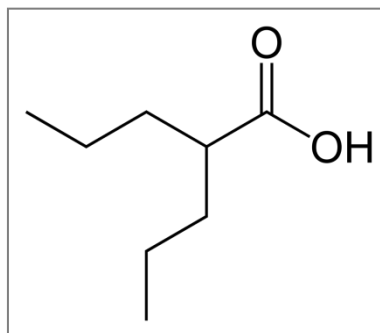


Abb. 4: Strukturformel von Valproinsäure (Rönndahl 2005)

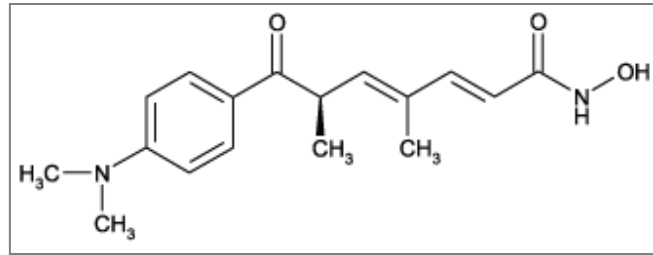


Abb. 5: Strukturformel von Trichostatin A (Rönndahl 2005)

1.3 Neuroblastome

Das Neuroblastom ist ein neuroendokriner Tumor, der den embryonalen Tumoren zugeordnet wird. Seine undifferenzierten Zellen gehen aus der Neuralleiste hervor und können überall entlang des paravertebralen Grenzstranges entstehen. Am häufigsten ist er jedoch in der Nebenniere lokalisiert. Das Neuroblastom ist der häufigste extrazerebrale, maligne Tumor im Kleinkindalter und die zweithäufigste bösartige Erkrankung bei Kindern insgesamt. Die Inzidenz liegt bei 1:5000 pro Jahr. 90% der Tumore treten vor Schulbeginn auf, 30% der Kinder sind bei Diagnosestellung jünger als ein Jahr. Bei mehr als 50% der Patienten liegt bei Diagnosestellung bereits eine Metastasierung vor (Hero et al. 2002). Als Besonderheit des Neuroblastoms im Säuglingsalter im Stadium 4s kommt es in einigen Fällen zu einer spontanen Regression des Tumors, die sich histologisch als Differenzierung des malignen Tumors in ein benignes Ganglioneurom darstellt (Haas et al. 1988). Die Stadieneinteilung erfolgt nach INSS-Kriterien. (International Neuroblastoma Staging System, Tab. 2)

Tab. 2: Stadieneinteilung des Neuroblastoms nach INSS-Kriterien (Brodeur et al. 1993)

Stadium 1	Lokalisierte Tumor mit makroskopisch kompletter Entfernung; kein Befall ipsi- und kontralateraler Lymphknoten; mit dem Tumor entfernte anhängende Lymphknoten dürfen befallen sein.
Stadium 2a	Lokalisierte Tumor mit makroskopisch inkompletter Entfernung; ipsilaterale (nicht am Tumor adhären) Lymphknoten sind histologisch ohne Tumorbefall.
Stadium 2b	Lokalisierte Tumor mit oder ohne makroskopisch kompletter Entfernung; ipsilaterale, nichtadhären Lymphknoten zeigen Tumorbefall; vergrößerte, kontralaterale Lymphknoten müssen histologisch unauffällig sein.
Stadium 3	Nichtresektabiler unilateraler Tumor, der die Mittellinie überschreitet, mit oder ohne Lymphknotenbefall <u>oder</u> unilateral lokalisierte Tumor mit kontralateralem Lymphknotenbefall <u>oder</u> Mittellinientumor mit bilateraler Ausdehnung durch Infiltration (nicht resektabel) oder durch Lymphknotenbefall.
Stadium 4	Dissemination des Tumors in Fernlymphknoten, Knochen, Knochenmark, Leber, Haut und/oder andere Organe.
Stadium 4s	Lokalisierte Primärtumor mit Dissemination in Haut, Leber und/oder Knochenmark. Nur bei Säuglingen im ersten Lebensjahr (in Knochenmarksbiopsie oder -aspiration) weniger als 10% aller kernhaltigen Zellen maligne. Bei größerem Anteil an Tumorzellen erfolgt die Einordnung als Stadium 4).

1.4 Bronchialkarzinome als neuroendokrine Tumore

Bronchialkarzinome sind eine heterogene Gruppe verschiedener maligner Tumore der Lunge. Nach Schätzungen des Robert-Koch-Instituts lag die Zahl der Neuerkrankungen im Jahr 2006 bei ca. 47.100, davon entfallen 32.500 Neuerkrankungen auf Männer und 14.600 auf Frauen. Zu Beginn der epidemiologischen Untersuchungen im Jahre 1980 zeigte sich eine deutlich höhere Neuerkrankungsrate für das männliche Geschlecht. Allerdings belegen neuere Daten, dass die Inzidenz für unter 40-jährige Frauen durch die Angleichung der Rauchgewohnheiten genauso hoch ist wie die gleichaltriger Männer. Das Bronchialkarzinom steht bei Männern hinter dem Prostatakarzinom und dem Kolonkarzinom an dritter Stelle der Krebstodesursachen. Bei Frauen nimmt es nach dem Mammakarzinom und dem kolorektalen Karzinom ebenfalls Rang drei der Krebstodesursachen ein (Robert Koch Institut, 2010). Der ätiologisch wichtigste Faktor für die Entstehung eines Bronchialkarzinoms ist das inhalative Zigarettenrauchen, insbesondere für die Entwicklung eines kleinzelligen Bronchialkarzinoms (small cell lung cancer, SCLC) und eines Plattenepithelkarzinoms, weniger für die Entstehung eines Adenokarzinoms.

Die histologische Einteilung erfolgt nach der WHO in kleinzellige, nicht kleinzellige und sonstige Karzinome. Prognose und Therapie sind nicht nur von der Histologie, sondern entscheidend auch vom Tumorstadium abhängig. Je nach histologischer Typisierung werden unterschiedliche Einteilungen der Tumorstadien angewendet. Das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom wird, wie in Tab. 3 zu sehen ist, in TNM-Stadien nach UICC (Union International Contre le Cancer; modifiziert nach Mountain 1997 und Watanabe 2003) unterteilt (Tab. 3a, Tab. 3b).

Tab. 3a: anatomische Tumorausbreitung nicht-kleinzelliger Bronchialkarzinome entsprechend der TNM-Klassifikation

Primärtumor - T	
TX	positive Zytologie
T1	≤ 3cm
T2	≥ 3cm, Hauptbronchus ≥ 2cm von der Carina tracheae, Invasion von viszeraler Pleura, partielle Atelektase
T3	Brustwand, Zwerchfell, Perikard, mediastinale Pleura, Hauptbronchus ≤ 2cm von der Carina tracheae, totale Atelektase
T4	Mediastinum, Herz, große Gefäße, Carina tracheae, Trachea, Ösophagus, getrennte Tumorherde in demselben Lungenlappen, maligner Erguss
Lymphknotenbefall - N	
N0	kein Lymphknotenbefall
N1	ipsilaterale peribronchiale bzw. hiläre Lymphknoten
N2	Ipsilaterale mediastinale bzw. subkarinale Lymphknoten
N3	Kontralaterale mediastinale, hiläre, ipsi- oder kontralaterale Skalenus- oder supraclavikuläre Lymphknoten
Metastasenstatus – M	
M0	Metastasen nicht nachweisbar
M1	Fernmetastasen, einschließlich von Primärtumor getrennter Tumorherd in einem anderen Lungenlappen (ipsi- oder kontralateral)

Tab. 3b: Stadieneinteilung des nicht kleinzelligen Bronchialkarzinoms nach der UICC 2003 basierend auf der TNM-Klassifikation

Okkultes Karzinom	0	IA	IB	IIA	IIB		IIIA			IIIB		IV
TX	Tis	T1	T 2	T1	T2	T3	T1	T2	T3	jedes T	T4	Jedes T
N0	N0	N0	N0	N1	N1	N0	N2	N2	N1 N2	N3	Jedes N	Jedes N
M0	M0	M0	M0	M0	M0	M0	M0	M0	M0	M0	M0	M1

Das kleinzellige Bronchialkarzinom (SCLC) geht aus neuroendokrinen Zellen hervor. Das Tumorgewebe führt durch die Expression neuraler Antigene zu einer Immunantwort, wodurch die Entstehung onkoneuraler Antikörper begünstigt wird. Diese können dann zu unterschiedlichen, durch Auto-Antikörper vermittelten paraneoplastischen, neurologischen Syndromen, wie dem Lambert-Eaton-Myasthenes-Syndrom (LEMS) oder der limbischen Enzephalitis (LE), führen. Aufgrund der bereits vorbestehenden sekretorisch-endokrinen Kompetenz der Zellen kann es jedoch nicht nur durch die Bildung von Auto-Antikörpern, sondern zusätzlich durch eine unkontrollierte Sekretion von Hormonen, wie ACTH, zu weiteren paraneoplastischen Syndromen kommen. Hierdurch ist die Inzidenz von paraneoplastischen Syndromen, die im Rahmen einer SCLC-Erkrankung auftreten, deutlich höher als bei vielen anderen Tumorerkrankungen. Das kleinzellige Bronchialkarzinom wird aufgrund seiner hohen Proliferationsrate als generalisierte Erkrankung betrachtet. Hierbei erfolgt die Einteilung entsprechend dem Vorschlag der Veterans Administration Lung Cancer Study Group in die zwei Stadien „Limited Disease“ (LD) und „Extensiv Disease“ (ED). Die LD kann anhand der TNM-Stadieneinteilung nach UICC weiter in kleinere Subgruppen aufgeschlüsselt werden (Tab. 3a, Tab. 3b).

In Deutschland wird auch die ED weiter unterteilt in ein auf den Thorax begrenztes Wachstum (ED I) und ein fortgeschrittenes Stadium (ED II; Tab. 4).

Tab. 4: Einteilung des Bronchialkarzinoms nach der Veterans Administration Lung Cancer Study Group

<p>Limited Disease (UICC-Stadien I-III B)</p>	<p>Begrenzung auf den initialen Hemithorax, Primärtumor und</p> <ul style="list-style-type: none"> - ipsilaterale hiläre Lymphknoten und/oder - ipsilaterale supraclaviculäre Lymphknoten und/oder - ipsi- und kontralaterale mediastinale Lymphknoten und - eventuell begleitende Atelektase und/oder - Rekurrens- und/oder Phrenikusparese
<p>Extensive Disease I (UICC-Stadien III B-IV)</p>	<p>Befall wie bei limited Disease und/oder</p> <ul style="list-style-type: none"> - kontralaterale hiläre Lymphknoten - kontralaterale supraclaviculäre Lymphknoten - Thoraxwandinfiltration - Pleuritis carcinomatosa - Vena cava superior (VCS-) Syndrom - Einbruch des Tumors in große mediastinale Gefäße
<p>Extensive Disease II</p>	<ul style="list-style-type: none"> - Metastasen in der kontralateralen Lunge - Maligner Pleuraerguss - Alle sonstigen hämatogenen Fernmetastasen

1.5 Fragestellung

Beeinflussen HDAC-Inhibitoren die neuronale Differenzierung von Tumorzellen?

Bereits 1998 zeigte die Arbeitsgruppe um Rocchi, dass es unter einer Butyratbehandlung zu einer Neuritenaussprossung bei Neuroblastomzellen kommt (Rocchi et al. 1998). Valproinsäure führte unter anderem zur Steigerung neuronaler Zelladhäsionsmoleküle (NCAM, CD 56) bei Neuroblastomzellen und hemmte deren Zellproliferation (Cinatl et al. 1996). Jüngste Untersuchungen im Rahmen von Hypoxieversuchen mit primär kultivierten corticalen Neuronen der Ratte legten allerdings eher nahe, dass die Behandlung mit HDAC-Inhibitoren Sodiumbutyrat und Trichostatin A eine Dedifferenzierung und Proliferation neuronaler Zellen bewirkt (Kim et al. 2009).

Diese Arbeit soll folgende Fragen beantworten:

1. Lässt sich anhand der Messung der Expressionsänderung typisch neuronaler bzw. nicht neuronaler Proteine feststellen, ob und wie neuroendokrine Tumorzellen unter der Behandlung von HDAC-Inhibitoren eine Änderung des neuronalen Differenzierungsverhaltens aufweisen?
2. Bestehen bei der Differenzierungsinduktion der HDAC-Inhibitoren Valproinsäure und Trichostatin A Ähnlichkeiten?

2. Material und Methoden

2.1. Materialien

all-trans Retinolsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
DMEM	N-2-Hydroxyethyl-piperazin-N'-2-ethanolsulfonsäure (HEPES; 25 mmol·l ⁻¹) gepuffertem Dulbecco's modified Eagele's Medium, Sigma-Aldrich Chemie GmbH, Taufkirchen, Deutschland
FACS-Puffer:	980 ml PBS-Puffer, 10 ml FKS, 10 ml NaN ₃ (Natriumacid, Sigma) 10-prozentig
FACS-Durchflusszytometer	Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
FACS-Permeab-Puffer:	FACS-Puffer mit 0.1% Saponin (Sigma)
FKS	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Gentamycin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
Metronidazol	Bayer AG, Leverkusen, Deutschland
PBS Puffer:	1 l Aqua dest, 8,5 g NaCl, 1,42 g Na ₂ HPO ₄ und 0,29 g NaH ₂ PO ₄
Penicillin G	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
Poly-L-Lysin	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Paraformaldehyd	Fluka Chemie GmbH, Buchs, Schweiz
Start-V [®] -Medium	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Streptomycin	PAA Laboratories GmbH, Cölbe, Deutschland
Trichostatin A	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Trypsin	Gibco-Invitrogen, Darmstadt, Deutschland
Valproinsäure	Sigma-Aldrich, Steinheim, Deutschland
Vortexer	Vortex-Genie2, Scientific Industries, New York, USA
Zellkulturschalen	Nunc GmbH & Co KG, Wiesbaden, Deutschland

Primäre Antikörper

Anti-human-MHC I	DAKO, Hamburg, Deutschland
Anti-human-MHC II	DAKO, Hamburg, Deutschland
Anti-human-p-Glykoprotein	DAKO, Hamburg, Deutschland
Anti-human-Neurofilament (70 kDa subunit)	DAKO, Hamburg, Deutschland
Anti-human-bcl-2-FITC	DAKO, Hamburg, Deutschland
Anti-mouse-IgG ₁ Isotyp	DAKO, Hamburg, Deutschland
Anti-rat-RT1-A	Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
Anti-human/mouse/rat-NCAM	Cedarlane Laboratories, Burlington,NC, Canada
Anti-human-Synaptotagmin	Transduction Laboratories, A BD Company, Lexington, KY, USA
Anti-HuD	Molecular probes, Leiden, Niederlande
Anti-p75 low affinity nerve growth factor-receptor	Biosource, Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland

Sekundäre Antikörper

FITC-anti-mouse/rat	BD Pharmingen, Heidelberg, Deutschland
FITC-anti-rabbit	DAKO, Glostrup, Denmark

2.2. Zellkultur

2.2.1 Zellkultur der etablierten Zelllinien

Es wurden verschiedene, im Labor bereits etablierte Zelllinien verwendet. Als neuronale differenzierte Zelllinien wurden die Neuroblastomzelllinien SKN-SH, SH-SY5Y und NMB sowie die ebenfalls neuronal differenzierten Bronchialkarzinomzelllinien H460, A549 und A510 ausgetestet. Als Kontrollzelllinien diente die Glioblastomzelllinie DK-MG und die Nierenfibroblasten-Zelllinie HEK 293.

Alle Zelllinien wurden identisch behandelt. Als Kulturmedium diente RPMI 1640 (Sigma, Steinheim) mit 10% fetalem Kälberserum (FCS, HyClone, PerbioScience, USA), 4 mmol/l L-Glutamin (Sigma, Steinheim) 20 mg/l Streptomycin (BiochromAG, Berlin) und 20.000 IE/l Penicillin (BiochromAG, Berlin).

Jeweils nach dem zweiten Tag der Aussaat wurde das Medium der Zellen gewechselt, am vierten Tag wurden die Zellen im Verhältnis 1:4 gesplittet. Hierfür wurden die am Boden adhären Zellen mit 0.25 g/l Trypsin (Gibco-Invitrogen) in Phosphat-gepuffertem Kochsalz (PBS) bei 37°C für 5 min inkubiert und dadurch abgelöst. Die Trypsinreaktion wurde durch die Zugabe von Zellkulturmedium und das darin enthaltene FCS gestoppt.

Zusätzlich wurden ausgewählten Zellkulturschalen die Histon-Deacetylasehemmer Valproinsäure (1.0 mM- Lösung) und Trichostatin A (1µMol- Lösung) als Differenzierungsagenzien für 48 Stunden zugesetzt.

2.2.2 Primärkultur Auerbach-Plexus

Das enterale Nervensystem kann hauptsächlich in zwei ganglionäre Netzwerke unterteilt werden: Den *Plexus myentericus* (Auerbach-Plexus) und den *Plexus submucosus* (Meißner-Plexus). Die Hauptaufgabe des *Plexus myentericus* ist die Kontrolle der Motilität, wohingegen die Neurone des *Plexus submucosus* an der Regulation des Ionentransports (z.B. Sekretion am Kryptenepithel) und der Mikrozirkulation beteiligt sind. Diese beiden Nervengeflechte durchziehen die Wand des gesamten Magen-Darm-Kanals, vom Ösophagus bis zum Rektum. Der *Plexus myentericus* befindet sich zwischen dem *Stratum circulare* (innen) und dem *Stratum longitudinale* (außen) der *Tunica muscularis*; der *Plexus submucosus* liegt zwischen

der Zirkulärschicht der Muskulatur und der *Tela submucosa* (Abb. 7). Beide Plexus unterscheiden sich sowohl in der Morphologie als auch in der Anzahl der beteiligten Neuronen. Der *Plexus submucosus* ist kleiner und feinmaschiger als der *Plexus myentericus*. Die Anzahl der Neuronen eines *Plexus submucosus* entsprechen etwa einem Fünftel der Neuronen eines *Plexus myentericus* (Furness & Costa 1987).

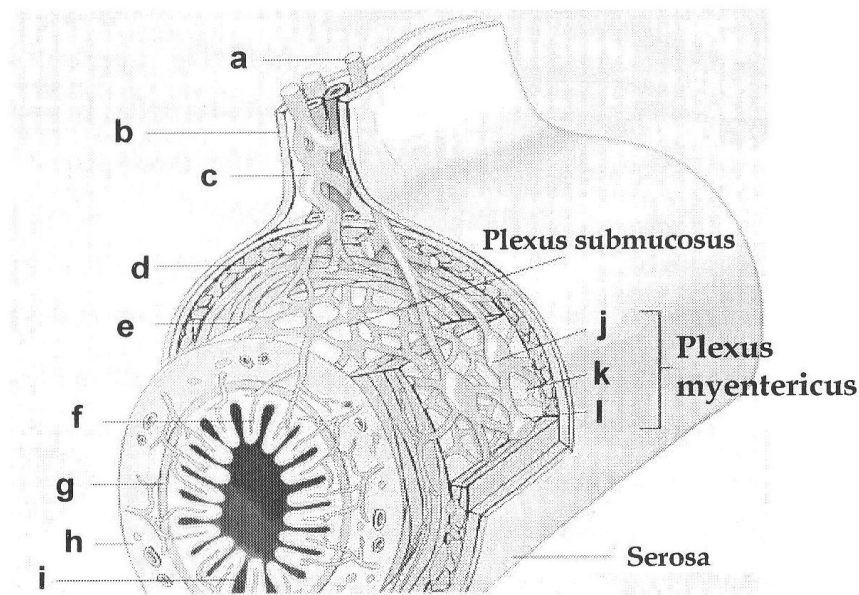


Abb. 6: Schematischer Schnitt durch die Darmwand des Dünndarms.

a: parasymphatische Fasern (N. vagus); b: Mesenterium; c: perivaskuläre sympathische Innervation; d: Längsmuskulatur; e: Zirkulärmuskulatur; f: subepithelialer Plexus; g: Muscularis mucosae; h: Submucosa; i: Zotten; j: Ganglion; k & l: Verzweigung (modifiziert nach Gershon & Erde 1981)

Bei den Versuchstieren handelte es sich um neugeborene Wistar-Ratten im Alter von drei bis elf Tagen. Es wurden Versuchstiere beiderlei Geschlechts verwendet. Die Tiere wurden in klimatisierten Räumen mit alternierenden Zyklen von je zwölf Stunden Helligkeit und Dunkelheit gehalten. Die Tiere wurden narkotisiert durch Dekapitation getötet und auf einer Korkplatte aufgespannt. Die Bauchdecke wurde mit einer Schere eröffnet. Das Mesenterium wurde möglichst nah am Darm vorsichtig abgesetzt, der Darm auf Höhe des Duodenums nach kranial und kaudal direkt proximal des Rektums abgesetzt und umgehend mit eiskaltem DMEM gewaschen. Die Lagerung und Präparation des Darmes erfolgte in DMEM, einem

bezugsfertigen Zellkulturmedium, welches neben HEPES auch einen hohen Glucoseanteil (25 mmol l^{-1}) enthält. Diesem Medium wurde vor Beginn der Präparation L-Glutamin (4 mmol l^{-1}) sowie Gentamycin (20 mg l^{-1}) und Metronidazol (5 mg l^{-1}) zugesetzt. In dem auf Eis gelagerten Präparationsschälchen mit DMEM erfolgte die weitere Feinpräparation. Die zweilagige *Tunica muscularis* wurde vorsichtig von der *Tela submucosa* gezogen. Die aus *Lamina transversalis* und *Lamina longitudinalis* bestehende *Tunica muscularis* wurde für die weitere Behandlung verwendet. Es folgten mehrere Inkubationsschritte, um die beiden Muskelschichten enzymatisch zu trennen und den *Plexus myentericus* freizugeben. Das Gewebe wurde mit Kollagenase Typ II (Endkonzentration 1 mg ml^{-1} ; Enzymaktivität: 268-273 Units/mg) im Kulturmedium inkubiert. Die Inkubation erfolgte in mehreren Schritten bei 37°C und $5\% \text{ CO}_2$. Der erste Inkubationsschritt erfolgte mit 90 min, jede weitere Inkubation erfolgte für je 20 min. Die Wiederholung der Inkubation erfolgte solange, bis der *Pl. myentericus* vollständig herausgelöst war. Nach jedem Inkubationsschritt wurde das Gewebe circa 15-30 sec auf einem Vortexschüttler resuspendiert. Anschließend erfolgte die Inspektion der Gewebslösung unter dem Stereoskop bei 12-facher Vergrößerung, wobei bereits vollständig von der Muskulatur gelöste Plexusstücke mit netzartigem Aussehen für die weitere Bearbeitung entnommen wurden (Abb. 7).

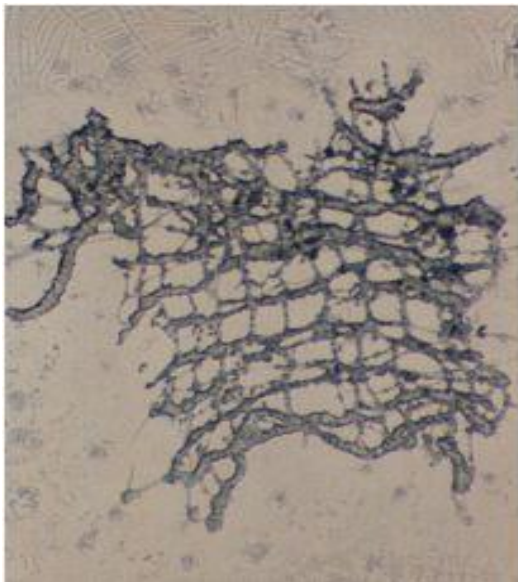


Abb. 7: präparierter Plexus myentericus mit netzartiger Struktur, Vergrößerung 1/100 (Schäufele 2005)

Nach kompletter Extraktion des *Pl. myentericus* erfolgte eine Spülung in eiskaltem DMEM und einer Zentrifugation bei 1000 rpm für 5 min. Der Überstand wurde entfernt. Nach Re-suspension auf dem Vortexschüttler und Zugabe von 400 µl DMEM erfolgte mithilfe einer dünnlumigen Injektionskanüle die Auflösung des Zellverbandes. Der Zellverband wurde durch mehrmaliges Aspirieren aufgelöst, bis keine Gewebestücke mehr vorhanden waren und eine Einzelzellsuspension vorlag (Abb. 8).

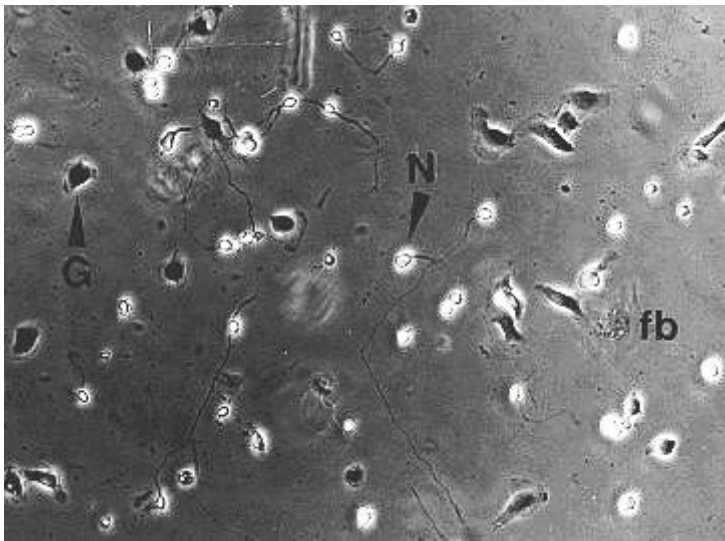


Abb. 8: dissoziierter Plexus myentericus, Vergrößerung 1/250, Phasenkontrastmikroskopie, N=Neuron, G=Gliazelle, fb=Fibroblast (Schäufele 2005)

Die *Plexus-myentericus*-Ganglien wurden in Start-V[®]-Medium in Kultur gebracht. Dies ist ein serumfreies, speziell auf die Kultur von neuronalen Zellen ausgerichtetes Fertigmedium. Diesem Kulturmedium wurden Penicillin G (100.000 units l⁻¹) und Streptomycin (100 mg l⁻¹) zugefügt.

Für die Primärkultur der Zellen wurden mit Poly-L-Lysin beschichtete Glasplättchen (13 mm Durchmesser) verwendet. Vor der Beschichtung wurden die Plättchen mindestens 120 min in 70% (Vol/Vol) Ethanol eingelegt. Nach viermaligem Spülen der Glasplättchen in autoklaviertem Aqua bidest. wurden diese in Poly-L-Lysin (0,1 mg·ml⁻¹; Molekulargewicht >300.000 D) 1:5 mit autoklaviertem Aqua bidest. verdünnt, eingelegt und auf dem Schüttler für mindestens 120 min langsam bewegt. Die beschichteten Plättchen wurden anschließend

auf einem Filterpapier in einer verschließbaren Glasschale aufgestellt, bei 4°C gekühlt und lichtgeschützt gelagert. Die Haltbarkeit dieser beschichteten Plättchen betrug maximal sieben Tage, danach war ein ausreichendes Anwachsen der Zellen nicht mehr sicher.

2.3. Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie oder auch FACS (Fluorescence Activated Cell Sorting) ist ein Verfahren zur quantitativen Bestimmung von Zellen und der Erfassung der Granularität. Die Zellen werden hierfür in eine Zellsuspension verbracht und passieren durch einen hydrodynamisch fokussierten Flüssigkeitsstrom einzeln einen Laser. Der Laserstrahl wird an den einzelnen Partikeln gebrochen und es entsteht ein Vorwärtsstreulicht bzw. Forwardscatter (FSC) und ein Seitwärtsstreulicht bzw. Sidescatter (SSC). Das Vorwärtsstreulicht wird mittels einer Fotodiode gemessen und gibt Aufschluss über die Größe einer Zelle. Das Seitwärtsstreulicht entsteht durch die Ablenkung des Laserstrahls sowohl an den Granula als auch an allen anderen Organellen der Zelle, sodass hiermit die Komplexität der Zelle repräsentiert wird. Der SSC wird durch sehr empfindliche Photomultiplertubes ermittelt. Anschließend wird diese gemessene elektrische Spannung in ein digitales Signal umgewandelt, sodass die gemessene Information speicherbar ist (Abb. 9).

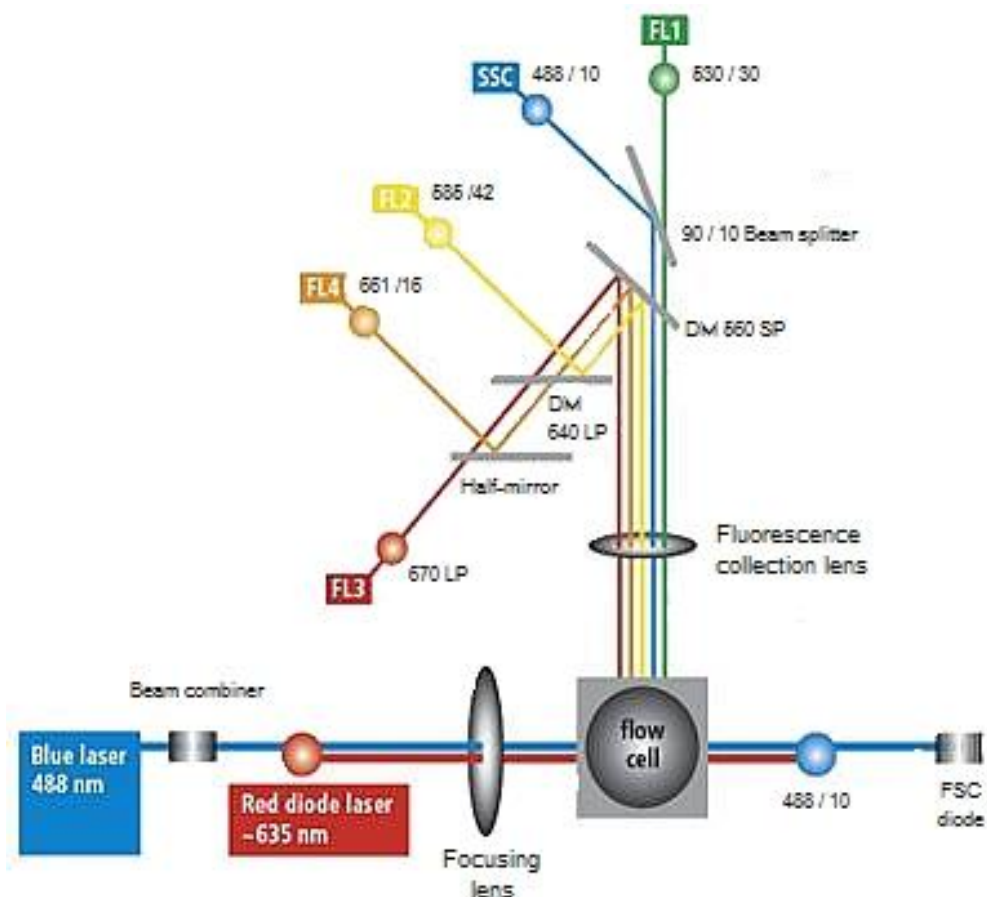


Abb. 9: Strahlengang des FACS Calibur: dichroide Spiegel mit der Bezeichnung SP (short pass) lassen nur Strahlung kürzerer Wellenlänge passieren, solche mit LP (long pass) nur Strahlen mit größerer Wellenlänge. Den jeweiligen Fotodetektoren ist ein Filter vorgeschaltet, der nur die entsprechende Wellenlänge passieren lässt (z. B. beim SSC 488/10) und sowohl die kürzer- als auch die längerwellige Strahlung reflektiert (modifiziert nach Becton, Dickinson and Company 2011)

Zusammenfassend besteht ein Durchflusszytometer somit aus drei Komponenten:

- a) dem aus einer Flüssigkeit bestehenden Transportsystem, welches die einzelnen Partikel der Messung zuführt;
- b) einem optischen System, wobei das an den Partikeln reflektierte Licht mittels verschiedener Linsen und frequenzspezifischer Spiegel zu den jeweiligen Detektoren geleitet wird;
- c) dem elektronischen System, dem sog. ADC (analogue to digital conversion), welches die elektrische Energie der Photonen in ein digitales Signal umwandelt und speichert.

Bei unseren Messungen wurde ein FACSCalibur (Becton Dickinson), ein gängiges Benchtop-Zytometer, verwendet. Um eine genaue Messung zu erreichen, ist es notwendig, dass jeweils nur eine Zelle zeitgleich zentral den Laserstrahl passiert. Das zu messende Partikel muss zwischen 0,2 μm und 150 μm groß sein und wird in einem Flüssigkeitsstrom transportiert, der in einen Hüllstrom injiziert wird. Dieser Hüllstrom wird mittels Kompression in der Messkammer (Flow Cell) fokussiert. Je höher der Kompressionsdruck ist, desto breiter ist der Probenstrom und desto mehr Partikel pro Sekunde müssen gemessen werden. Dadurch kommt es zu einer Verringerung der Auflösung und damit zu einer höheren Ungenauigkeit. Reguliert wird der Probedruck durch vorgegebene Grundeinstellungen, bei denen zwischen unterschiedlich hohem Druck gewählt werden kann (high, medium und low). Für die durchgeführten Messungen wurde die Einstellung „low“ gewählt.

Als Lichtquelle wurde ein blauer Argonlaser mit einer Wellenlänge von 488 nm verwendet. Um die Zielzellstrukturen vergleichend messbar zu machen, wurden sie in den Versuchen durch einen FITC (Fluorescein-Isothiocyanat)-markierten sekundären Antikörper gekennzeichnet. Das Fluorescein-Isothiocyanat wird bei 488nm durch die Absorption eines Photons angeregt und geht anschließend wieder in einen Zustand niedrigerer Energie zurück, was zu einer spontanen Emission von Licht führt. Bei dem FACSCalibur kann des Weiteren ein zweiter Laser (roter Neon-Heliumlaser) verwendet werden, der bei einer Wellenlänge von 633 nm anregt. Das optische System dient der Messung der erzeugten Strahlung. Die Fotodetektoren messen unspezifisch das ankommende Licht. Welche Strahlung die Detektoren erreicht, hängt also vom Strahlengang und den verwendeten Spiegeln ab (Abb. 7). Die von den Fotodetektoren gemessene Energie wird anschließend vom ADC-System in ein digitales Signal umgewandelt.

Für die hier durchgeführten Versuche wurden immortalisierte Zelllinien verwendet: Die Neuroblastomzelllinien SKN-SH, SH-SY5Y und NMB, die Bronchialkarzinomzelllinien A510, A549 und H460 sowie die nicht neuronal differenzierte Kontrollgruppe, bestehend aus HEK und DK-MG in der exponentiellen Wachstumsphase. Es wurde jeweils eine Zellpopulation, wie in Kapitel 2.2.1 beschrieben, mit unterschiedlichen Differenzierungsagenzien vorbehandelt und dann mit verschiedenen Antikörpern inkubiert. Anschließend konnten die Gruppen bezüglich ihres Bindungsverhaltens verglichen werden.

Um eine durchflusszytometrische Messung durchzuführen, wurden die vorbehandelten Zellen zunächst mit Trypsin (2.5 g/L) für 5min bei 37°C und 5% CO₂ abgelöst. Die Wirkung des

Trypsins wurde durch die Zugabe von FCS-haltigem Medium gestoppt. Nach Zentrifugation der Suspension bei 250 g für 5 min und 25°C wurde der Überstand abpipettiert und das Pellet in 5 ml FACS-Puffer resuspendiert, um die Zellzahl zu ermitteln. Die Suspension wurde erneut zentrifugiert, der Überstand entfernt und die Zellen nach entsprechender Resuspendierung in FACS-Puffer in einer Konzentration $10^5/75 \mu\text{l/well}$ in eine 96-Well-Platte mit runden Böden verteilt. Die 96-Well-Platte wurde dann für 5 min bei 250 g und 25°C zentrifugiert und der Überstand entfernt. Die Resuspendierung erfolgte durch Vortexen im verbleibenden FACS-Puffer. Es wurden sowohl extra- als auch intrazelluläre Zielproteine gemessen. Da für die intrazelluläre Antikörpermarkierung die Zellmembran permeabilisiert werden musste, unterschied sich ab diesem Zeitpunkt das Protokoll für die extra- und intrazelluläre Markierung.

2.3.1. Protokoll für die extrazelluläre Färbung

Auf die resuspendierten Zellpellets wurden 50 μl des verdünnten Primärantikörpers (Verdünnung siehe Tab. 4) pro Well hinzugefügt. Sowohl die Negativkontrolle als auch die Isotypkontrolle, welche zur Überprüfung der unspezifischen Bindung notwendig ist, wurden ausschließlich mit FACS-Puffer behandelt. Der Primärantikörper wurde für 20 min bei 4°C inkubiert. Danach wurden pro Well jeweils 75 μl FACS-Puffer hinzu pipettiert und die Platte bei 250 g für 5 min bei 4°C zentrifugiert, der Überstand entfernt und das Zellpellet auf dem Vortexer resuspendiert. Anschließend wurde jedes Well mit 100 μl FACS-Puffer versehen, erneut zentrifugiert und der Überstand entfernt. Dann erfolgte die Zugabe von 50 μl FITC-markiertem Sekundärantikörper (Verdünnung siehe Tab. 4) pro Well. Die Negativkontrolle wurde wiederum nur mit FACS-Puffer behandelt, in das Well der Isotypkontrolle wurden ebenfalls 50 μl des FITC-markierten Sekundärantikörpers pipettiert. Es erfolgte eine zweite Inkubationszeit von 20 min bei 4°C. Anschließend wurden den Wells jeweils 75 μl FACS-Puffer hinzugefügt, die Platte erneut zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Danach erfolgte ein Waschschrift mit 100 μl FACS-Puffer, erneuter Zentrifugation und Entfernung des Überstandes. Abschließend wurden die Zellen in 200 μl FACS-Puffer resuspendiert und am FACSCalibur Durchflusszytometer gemessen.

Tab. 5: Verwendete Antikörper und Verdünnungsprotokoll der extrazellulären Markierung

Primärantikörper	Verdünnung	Sekundärantikörper	Verdünnung
Isotyp	1/50	FITC-anti-mouse/rat	1/75
MHC I	1/50	FITC-anti-mouse/rat,	1/75
NCAM	1/50	FITC-anti-mouse/rat,	1/75
MHC II	1/50	FITC-anti-mouse/rat,	1/75
p-75	1/50	FITC-anti-mouse/rat,	1/75

2.3.2. Protokoll für die intrazelluläre Färbung

Die resuspendierten Zellen wurden mit einer 1.5% Paraformaldehydlösung (PFA) für 20 min bei 4°C fixiert. Anschließend wurden 75 µl FACS-Puffer pro Well hinzupipettiert, die 96-Well-Platte dann bei 250 g und 4°C zentrifugiert und der Überstand entfernt (Verdünnungsschritt). Danach erfolgte ein Waschschriff, in dem jedes Well mit 100 µl FACS-Puffer versehen wurde. Die Platte wurde erneut zentrifugiert und der Überstand entfernt. Zur Permeabilisierung der Zellen erfolgte nun ein Waschschriff mit Permeabilisierungspuffer (FACS-Puffer mit 0.1% Saponin, Sigma). Es folgte die Inkubation der Zellen mit dem jeweiligen mit Permeabilisierungspuffer verdünnten Primärantikörper (siehe Tab. 5). Auch hier wurde als Negativkontrolle ein Well nur mit dem Permeabilisierungspuffer behandelt. Zur Kontrolle der unspezifischen Bindungen wurden Isotypfärbungen in unterschiedlichen Konzentrationen (siehe Tab. 5) parallel zu den Konzentrationen der Primärantikörper durchgeführt. Die Inkubation erfolgte 20 min bei 4°C. Anschließend folgten ein Verdünnungsschriff mit 75 µl Permeabilisierungspuffer und zwei Waschschriffe mit je 100 µl Permeabilisierungspuffer. Darauf folgte die Inkubation mit 50 µl des entsprechenden FITC-markierten sekundären Antikörpers (Tab. 5) für 20 min bei 4°C. Die überschüssigen, nicht gebundenen Antikörper wurden durch einen Verdünnungsschriff mit 75 µl Permeabilisierungspuffer und einem Waschschriff mit je 100 µl des Permeabilisierungspuffers entfernt. Abschließend erfolgte ein Waschschriff mit FACS-Puffer ohne Saponinzusatz, um die Zellmembran zu stabilisieren und die Zellen im Durchflusszytometer messbar zu erhalten. Nach erneuter Zentrifugation und Dekantieren des Überstandes wurde das Zellpellet mit 200 µl des FACS-Puffers resuspendiert, bevor die Messung am Durchflusszytometer erfolgte. Unmittelbar vor der jeweiligen Messung wurden die Probenröhrchen kräftig geschüttelt.

Tab. 6: Verwendete Antikörper und Verdünnungsprotokoll der intrazellulären Markierung

Primärantikörper	Verdünnung	Sekundärantikörper	Verdünnung
Isotyp	1/50	FITC-anti-mouse	1/75
Isotyp	1/200	FITC-anti-mouse	1/75
Anti-Hu (mouse)	1/50	FITC-anti-mouse	1/75
Anti-NF (mouse)	1/200	FITC-anti-mouse	1/75
Anti-Synaptotagmin (mouse)	1/50	FITC-anti-mouse	1/75
FACS-Puffer		FITC-anti-bcl-2	1/50

3 Statistik

Die Werte sind als Mittelwert \pm Standardabweichung angegeben. Vergleiche der Mittelwerte erfolgte mit Hilfe des t-Tests; bei Vergleichen von mehr als zwei Gruppen wurden die Daten mittels des ANOVA-Tests auf ihre Signifikanz überprüft. Ein $p < 0.05$ wurde als signifikant betrachtet. Die statistische Auswertung erfolgte mit dem Programm Graphpad Prism 4®. Ergab sich bei der Messung der mittleren Fluoreszenzintensität (mfi) bei der Durchflusszytometrie durch den Abzug der Isotypenkontrolle ein negativer Wert, so wurde dieser gleich 1 gesetzt.

4 Resultate

4.1. Basale Proteinexpression

Es wurden acht Zelllinien bezüglich ihrer basalen Proteinexpression verglichen. Hierzu wurden die Zelllinien in drei Gruppen untergliedert: Die Gruppe der Neuroblastomzelllinien, zu denen die SKN-SH, die SH-SY5Y und die NMB Zelllinie gehören, die Gruppe der Bronchialkarzinomzelllinien A510, A549 und H460 mit ihrer ebenfalls neuronalen Differenzierung sowie der nicht neuronal differenzierten Kontrollgruppe, die aus HEK 293 und DK MG bestand. Des Weiteren erfolgte die Verwendung von primär kultivierten neuronalen Zellen des *Plexus myentericus* aus der Ratte.

4.1.1. Basale Expression neuronaler Proteine

Neurofilament (70 kDa): Sämtliche Zelllinien zeigten eine basale Expression von NF. Sowohl im Vergleich zu den Bronchialkarzinomzelllinien als auch im Vergleich mit den Kontrollzelllinien zeigte sich jedoch die basale Expression von Neurofilament in den Neuroblastomzelllinien signifikant höher. (NB 64.5 ± 17.9 , BC 4.7 ± 3.9 , Co 4.7 ± 3.6 , $p < 0.05$; Abb. 10)

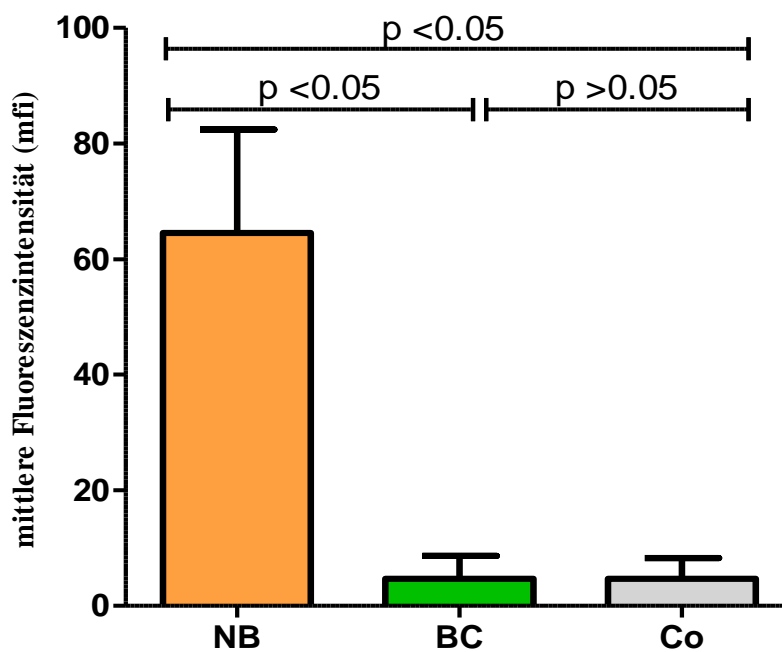


Abb. 10: Basale Expression von Neurofilament (70 kDa); NB-Neuroblastomzelllinien, BC-Bronchialkarzinomzelllinien, Co-Kontrollzelllinien

NCAM: Sämtliche Neuroblastomzelllinien zeigten eine deutliche basale NCAM-Expression. Bei zwei der drei Bronchialkarzinomzelllinien (H460 und A510) und bei den Kontrollzelllinien ließ sich ebenfalls eine basale Expression von NCAM nachweisen. (NB 177.1 ± 44.2 , BC 70.9 ± 72.8 , Co 95.1 ± 59.7 , $p > 0.05$; Abb. 11)

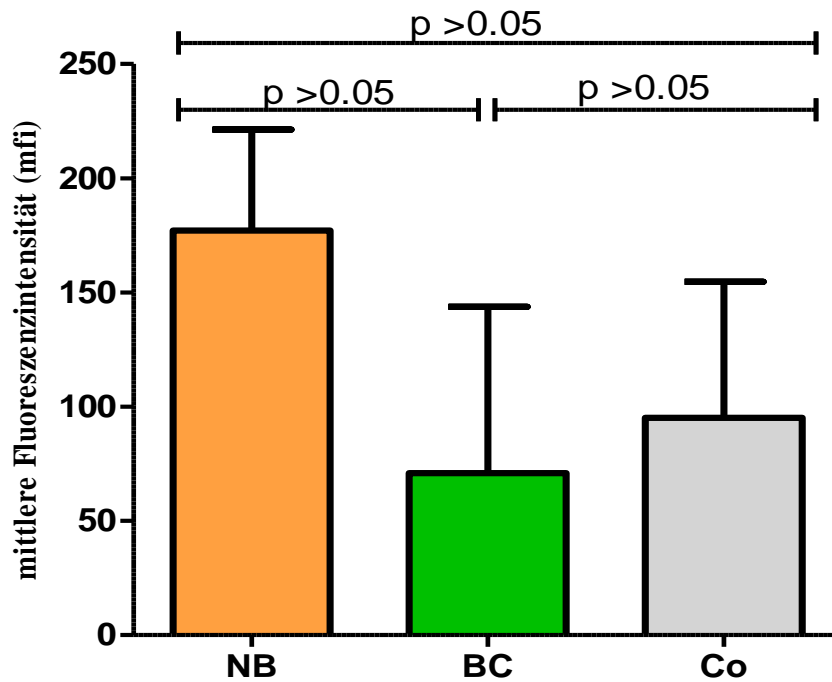


Abb. 11: Basale Expression von NCAM; NB-Neuroblastomzelllinien, BC-Bronchialkarzinomzelllinien, Co-Kontrollzelllinien

HuD: Ausschließlich die Neuroblastomzelllinien und eine der drei Bronchialkarzinomzelllinien (H460) wiesen eine basale Expression von HuD auf. Hierbei exprimierten die Neuroblastomzelllinien signifikant stärker HuD als die Kontrollzelllinien. (NB 46.5 ± 18.8 , BC 14.3 ± 1.1 , Co 7.3 ± 4.8 , $p < 0.05$; Abb. 12)

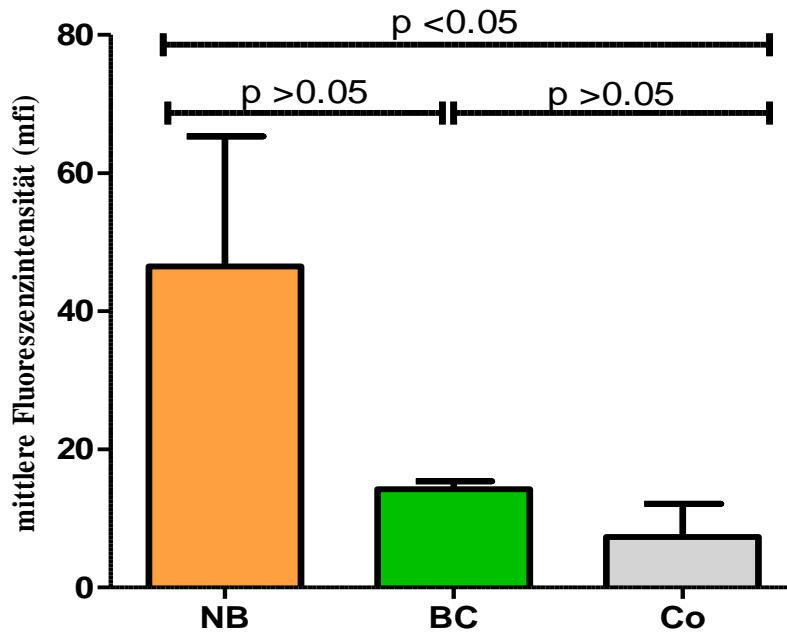


Abb. 12: Basale Expression von HuD; NB-Neuroblastomzelllinien, BC-Bronchialkarzinomzelllinien, Co-Kontrollzelllinien

Synaptotagmin: Nur eine der drei Neuroblastomzelllinien (SH-SY5Y) und zwei der drei Bronchialkarzinomzelllinien (H460 und A549) zeigten eine minimale basale Expression von Synaptotagmin. (NB 2.4 ± 2.4 , BC 1.7 ± 0.7 , Co 3.6 ± 3.7 , $p > 0.05$; Abb. 13)

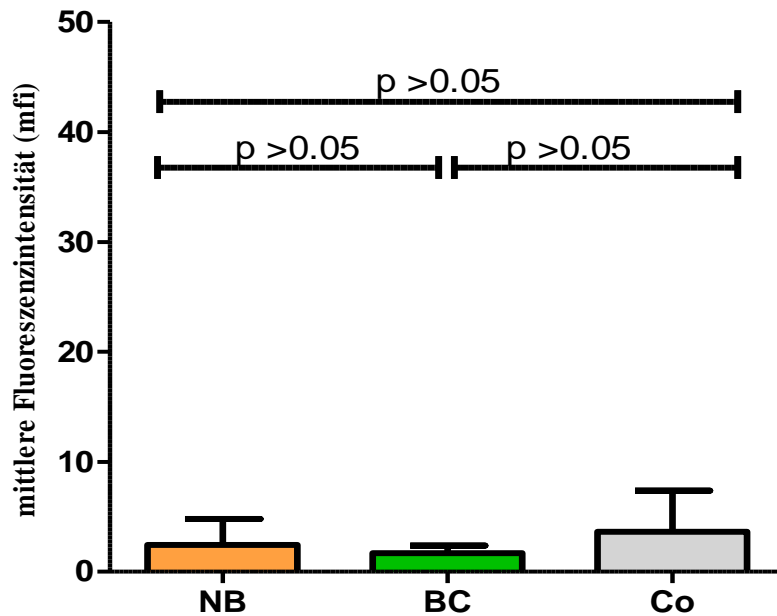


Abb. 13: Basale Expression von Synaptotagmin; NB-Neuroblastomzelllinien, BC-Bronchialkarzinomzelllinien, Co-Kontrollzelllinien

p-75. Bei allen Neuroblastomzelllinien und beiden Kontrollzelllinien, jedoch nur bei einer der drei Bronchialkarzinomzelllinien (A549) konnte eine basale Expression von p-75 nachgewiesen werden. (NB 16.4 ± 5.1 , BC 8.8 ± 13.6 , Co 164.2 ± 220.9 , $p > 0.05$; Abb. 14)

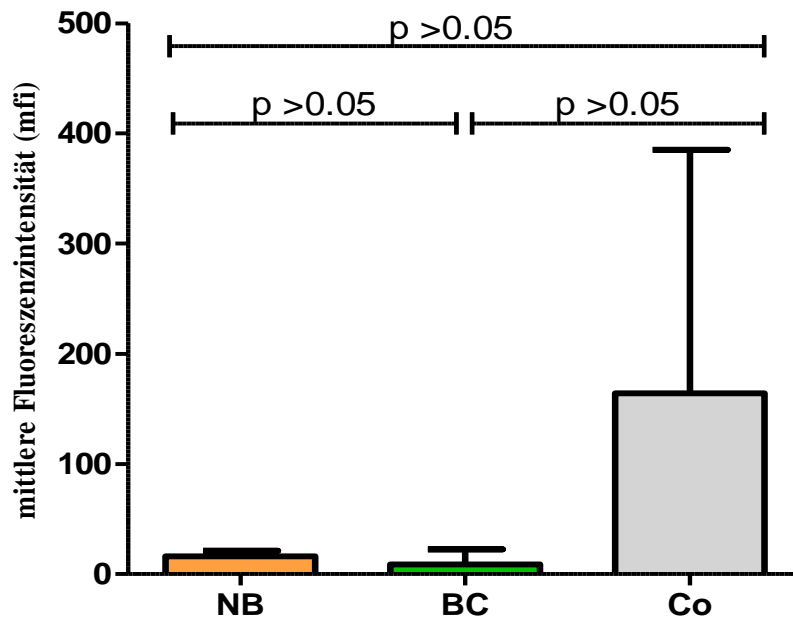


Abb. 14: Basale Expression von p-75; NB-Neuroblastomzelllinien, BC-Bronchialkarzinomzelllinien, Co-Kontrollzelllinien

4.1.2. Basale Expression nicht-neuronaler Proteine

MHC Klasse I: Die Neuroblastomzelllinien wiesen eine signifikant geringere MHC Klasse I-Expression auf als die Kontrollzelllinien. Auch bei den Bronchialkarzinomzelllinien ließ sich eine MHC Klasse I-Expression an der Zelloberfläche nachweisen. (NB 30.2 ± 37.8 , BC 156.1 ± 157.7 , Co 401.1 ± 93.2 , NB vs. Co, $p < 0.05$; Abb. 15)

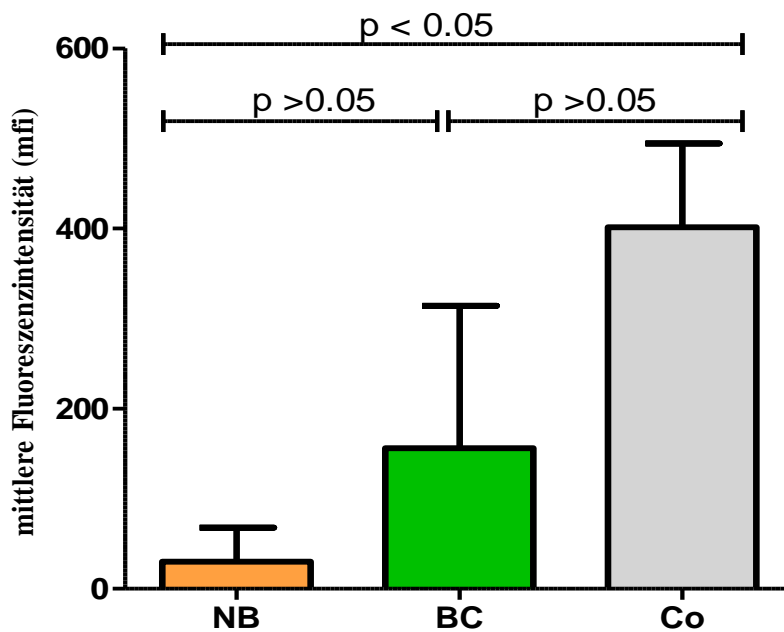


Abb. 15: Basale Expression von MHC Klasse I; NB-Neuroblastomzelllinien, BC-Bronchialkarzinomzelllinien, Co-Kontrollzelllinien

MHC Klasse II: Jeweils eine der drei Neuroblastomzelllinien (NMB), eine der drei Bronchialkarzinomzelllinien (A510) sowie eine der beiden Kontrollzelllinien (HEK) wiesen unstimuliert eine geringe MHC Klasse II-Expression auf. (NB 3.7 ± 4.60 , BC 26.0 ± 43.3 , Co 28.2 ± 38.5 , $p > 0.05$; Abb. 16)

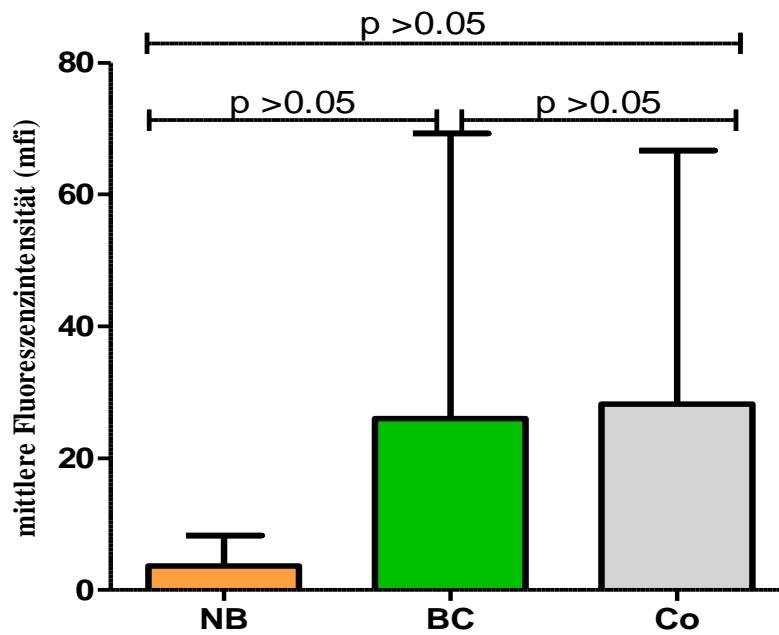


Abb. 16: Basale Expression von MHC Klasse II; NB-Neuroblastomzelllinien, BC-Bronchialkarzinomzelllinien, Co-Kontrollzelllinien

Bcl-2: Alle Neuroblastomzelllinien zeigten eine basale Expression von bcl-2, aber bei nur zwei der drei Bronchialkarzinomzelllinien (H460, A510) und einer der beiden Kontrollzelllinien (HEK) konnte ebenfalls eine basale bcl-2-Expression nachgewiesen werden. (NB 13.1 ± 11.9 , BC 23.9 ± 37.9 , Co 1.41 ± 0.6 , $p > 0.05$; Abb. 17)

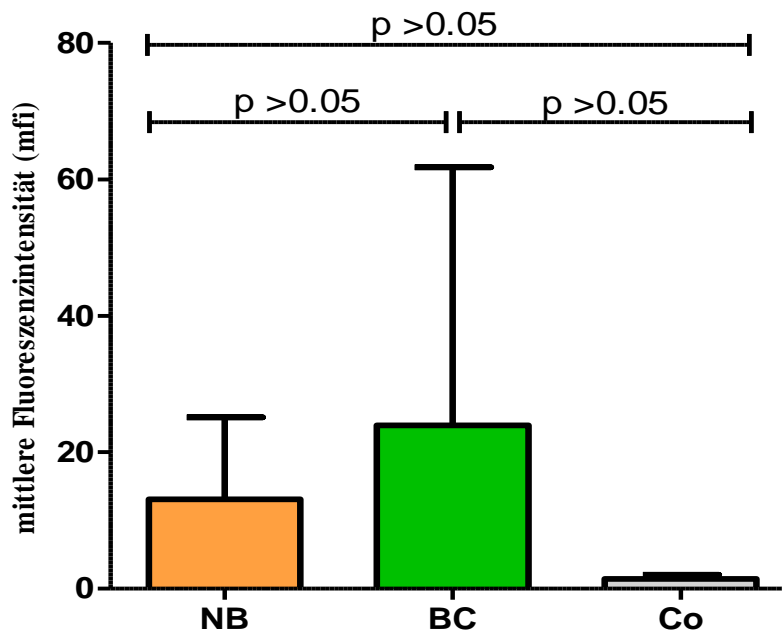


Abb. 17: Basale Expression von bcl-2; NB-Neuroblastomzelllinien, BC-Bronchialkarzinomzelllinien, Co-Kontrollzelllinien

Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass die Neuroblastomzelllinien basal eine typische neuronale Differenzierung aufwiesen. Bei den Bronchialkarzinomzelllinien fand sich ein sehr heterogenes Expressionsverhalten. Die Kontrollzelllinien wiesen im Gegensatz zu den anderen Zelllinien eine deutliche MHC Klasse I-Expression auf (Tab. 7)

Tab. 7: Übersicht über die basale Expression aller gemessenen Proteine und Zelllinien:

– keine Expression, + geringe Expression, ++ mittlere Expression, +++ starke Expression

	NF	NCAM	HuD	Synapto- tagmin	p75	MHC I	MHC II	bcl-2
SKN-SH	+++	+	++	+	+	-	-	++
SH-SY5Y	+++	+++	+++	+++	++	+	-	+++
NMB	+++	+++	+++	-	++	-	++	++
H460	++	+	++	++	-	++	-	+
A549	+	-	+	++	+++	++	-	-
A510	-	++	+	-	-	+	+++	+++
DK-MG	-	-	-	-	+++	+++	-	-
HEK	+	++	-	+++	+	+++	+++	+

4.2 Expressionsänderung unter Stimulation mit Valproinsäure (VPA)

4.2.1 Expressionsänderung neuronaler Proteine unter VPA-Stimulation

NF: VPA-Stimulation führte bei zwei der drei Neuroblastomzelllinien (SH-SY5Y und NMB) zu einer Herabregulierung der NF-Expression. Die Bronchialkarzinomzelllinien zeigten insgesamt eine leichte Hochregulation der Expression, die Messwerte innerhalb der Gruppe zeigten sich jedoch heterogen. Zwei der drei Bronchialkarzinomzelllinien (H460 und A549) wiesen eine Herabregulation auf; die Zelllinie A510 reagierte jedoch mit einem Expressionsanstieg von 90.63%. Die Kontrollzelllinien zeigten eine leichte Herabregulation der NF-Expression (NB $-36.3 \pm 23.6\%$, BC $+15.2 \pm 65.7\%$, Co $-4.6 \pm 14.5\%$, $p > 0.05$; Abb. 18).

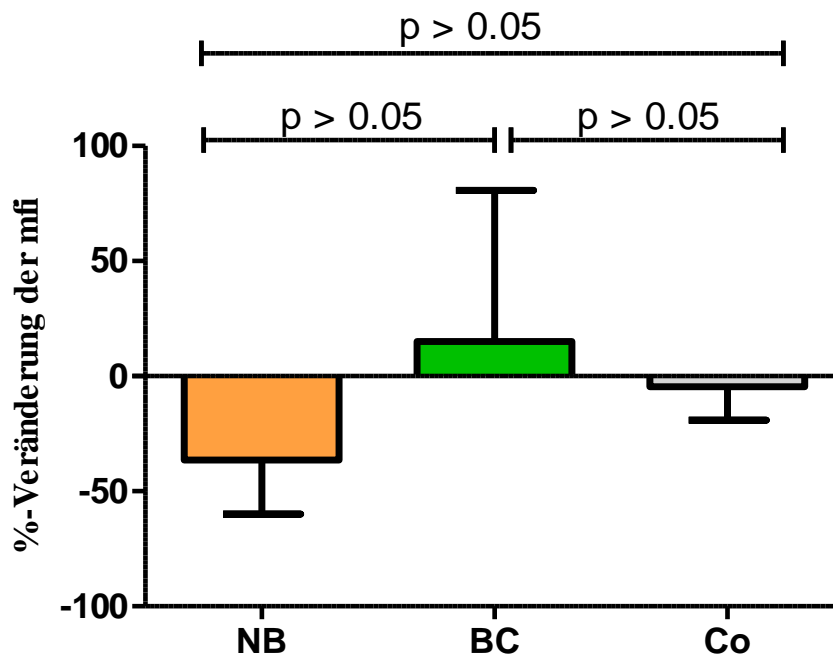


Abb. 18: Prozentuale Veränderung der Neurofilament-Expression nach Valproinsäure-Stimulation

NCAM: Sämtliche Gruppen zeigten einen Anstieg der Expression von NCAM unter der Stimulation mit VPA. Bei einer Betrachtung der einzelnen Zelllinien zeigte sich auch hier ein unterschiedliches gruppeninternes Verhalten. Bei zwei von drei Neuroblastomzelllinien (SKN-SH + 52.7%, SH-SY5Y + 24.1%) kam es zu einer Hochregulation der NCAM-Expression. Ebenso zeigte eine der drei Bronchialkarzinomzelllinien (A549: +270.3%) eine deutliche Expressionssteigerung, eine weitere Bronchialkarzinomzelllinie (A510: -26.5%) wies eine leichte Verminderung der Expression von NCAM auf. (NB $25.4 \pm 26.7\%$, BC $86.0 \pm 160.9\%$, Co $125.8 \pm 102.1\%$, $p > 0.05$; Abb. 19)

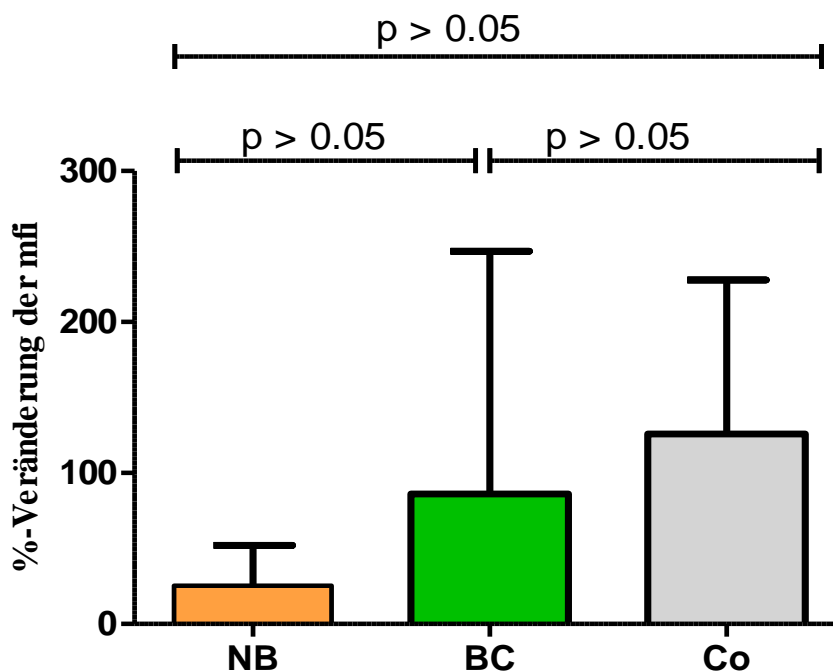


Abb. 19: Prozentuale Veränderung der NCAM-Expression nach Valproinsäure-Stimulation

HuD: Die VPA-Stimulation führte bei allen Neuroblastomzelllinien zu einer Herabregulation der HuD-Expression, ebenso bei zwei der drei Bronchialkarzinomzelllinien (H460 -15.1%, A549 -18.5%) und bei einer der beiden Kontrollzelllinien (HEK -19.9%) (NB -23.4 ± 15.2%, BC -9.6 ± 12.6%, Co -7.5 ± 17.6%, $p > 0.05$; Abb. 20)

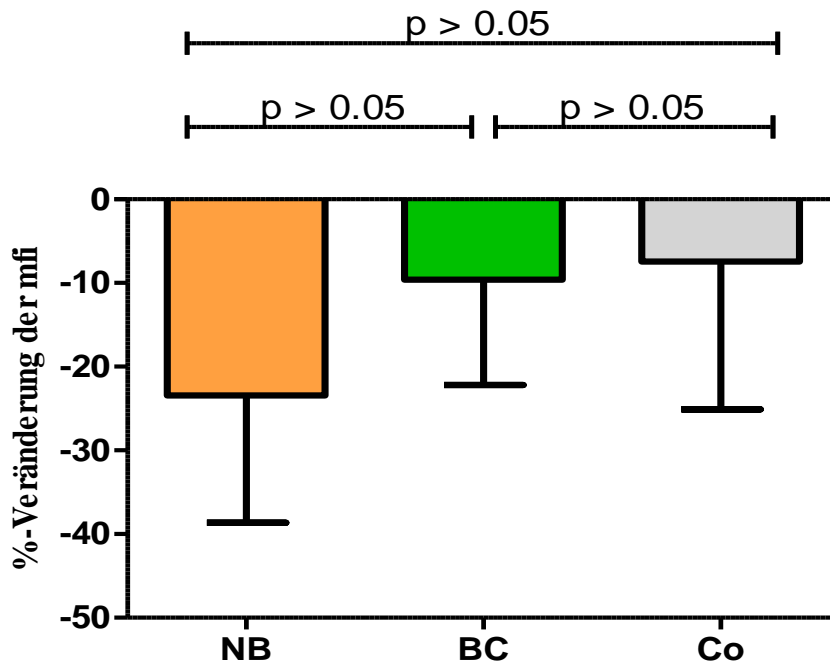


Abb. 20: Prozentuale Veränderung der HuD-Expression nach Valproinsäure-Stimulation

Synaptotagmin: Sowohl die Neuroblastomzelllinien als auch die Bronchialkarzinomzelllinien wiesen unter VPA-Stimulation eine leichte Hochregulation der Synaptotagmin-Expression auf. Bei den Kontrollzelllinien fand sich eine leichte Herabregulierung. Das Expressionsverhalten innerhalb der einzelnen Gruppen war jedoch uneinheitlich. So wurde innerhalb der Neuroblastomzelllinien eine deutliche Hochregulation der Expression von Synaptotagmin der NMB-Zelllinie (+85.2%) beobachtet, die Zelllinie SH-SY5Y (-18.4%) wies eine Herabregulation auf und die Zelllinie SKN-SH veränderte ihr Expressionsverhalten von Synaptotagmin unter VPA-Stimulation nicht. Zwei der drei Bronchialkarzinomzelllinien zeigten eine Verminderung der Expression (H460 -6.25% und A549 -10.6%). Die dritte Bronchialkarzinomzelllinie (A510 +36.4%) zeigte eine leichte Zunahme der Synaptotagmin-Expression unter VPA-Stimulation. Die Kontrollzelllinie HEK (-15.8%) wies eine leichte Herabregulation auf. (NB $20.65 \pm 56.28\%$, BC $6.52 \pm 25.95\%$, Co $-5.52 \pm 14.47\%$, $p > 0.05$; Abb. 21)

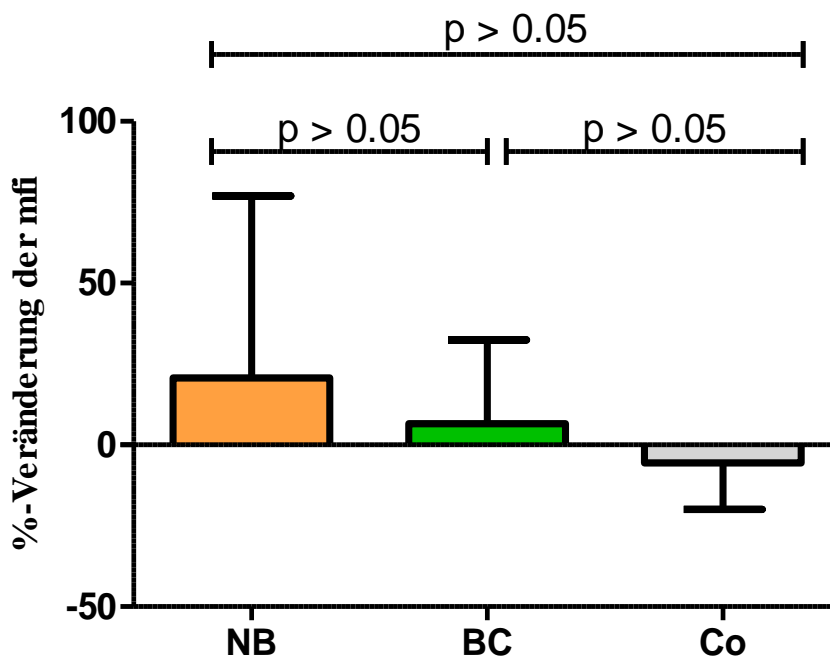


Abb. 21: Prozentuale Veränderung der Synaptotagmin-Expression nach Valproinsäure-Stimulation

p75: Sämtliche VPA-stimulierten Neuroblastomzelllinien wiesen einen deutlichen Anstieg der p-75-Expression auf. Ebenso zeigten zwei der drei untersuchten Bronchialkarzinomzelllinien (A549 +77.2%, A510 +114.5%) unter Stimulation eine Hochregulation der Expression, allerdings konnte eine Hochregulation auch bei einer der beiden Kontrollzelllinien (HEK +186.83%) nachgewiesen werden. (NB $183.0 \pm 60.1\%$, BC $75.2 \pm 40.41\%$, Co $81.8 \pm 148.6\%$, $p > 0.05$; Abb. 22).

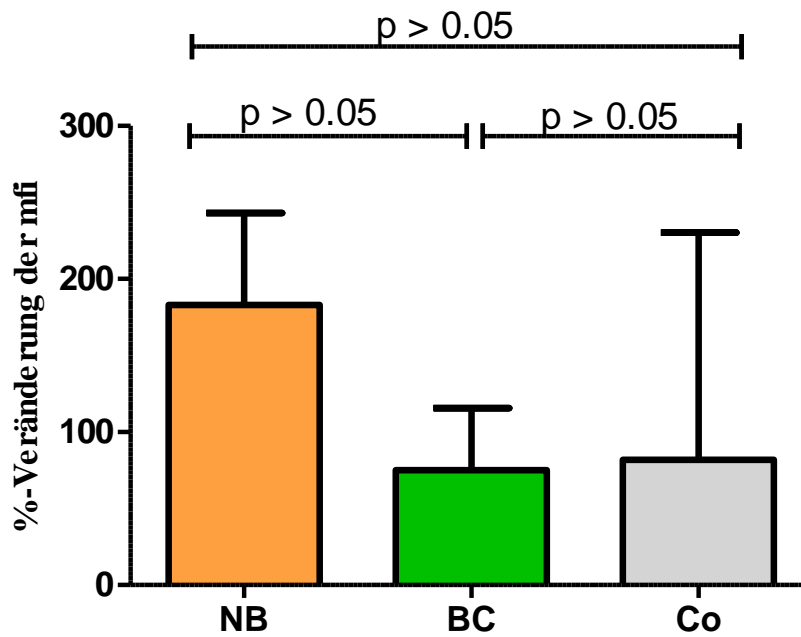


Abb. 22: Prozentuale Veränderung der p-75-Expression nach Valproinsäure-Stimulation

4.2.2 Expressionsänderung nicht-neuronaler Proteine unter VPA-Stimulation

MHC Klasse I: Die VPA-Stimulation führte bei Neuroblastomzellen, nicht jedoch bei Bronchialkarzinomzellen oder der Kontrollzelllinie zu einer signifikanten Steigerung der MHC Klasse I-Expression (NB $319.0 \pm 58.19\%$; BC $55.85 \pm 57.30\%$, Co $10.21 \pm 1.195\%$, $p < 0.05$) (Abb. 23 und Abb. 24)

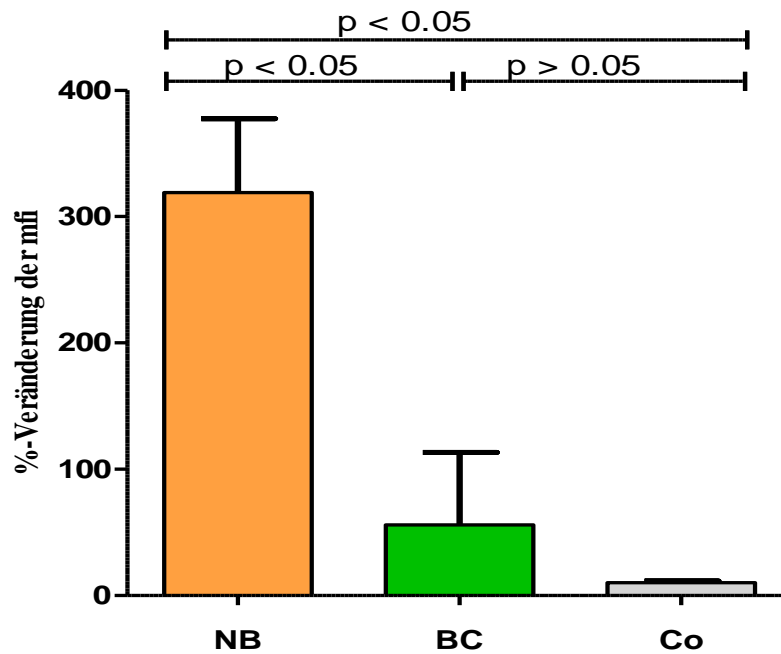


Abb. 23: Prozentuale Veränderung der MHC Klasse I-Expression nach Valproinsäure-Stimulation

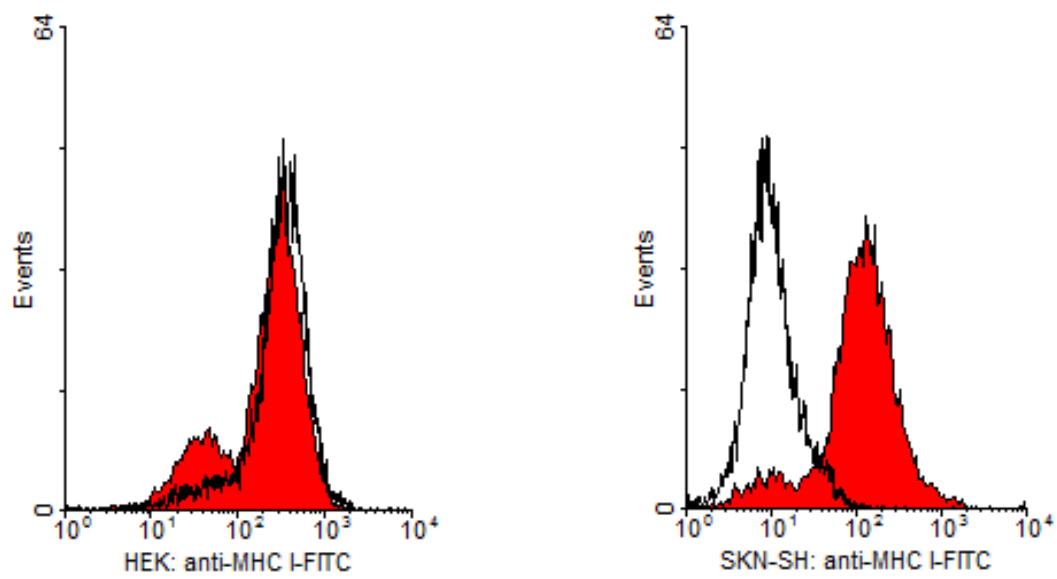


Abb. 24: Durchflusszytometrische Analyse der basalen Expression von MHC Klasse I in HEK (offene Kurve links) und SKN-SH (offene Kurve rechts) sowie nach der 48 h-Inkubation mit Valproinsäure (ausgefüllte Kurven links und rechts)

MHC Klasse II: Insgesamt zeigten die stimulierten Neuroblastomzelllinien eine deutlich höhere Hochregulation als die Bronchialzelllinien oder die Kontrollzelllinien (NB 212.1 ± 271.2%, BC 18.32 ± 50.32%, Co 18.05 ± 52.18%, $p > 0.05$). Alle Neuroblastomzelllinien reagierten mit einer gesteigerten Expression auf die Stimulation mit VPA. Eine der drei Bronchialkarzinomzelllinien (A510 +76.0%) wies ebenfalls eine Hochregulation auf, ebenso eine der beiden Kontrollzelllinien (HEK +55.4%). (Abb. 25)

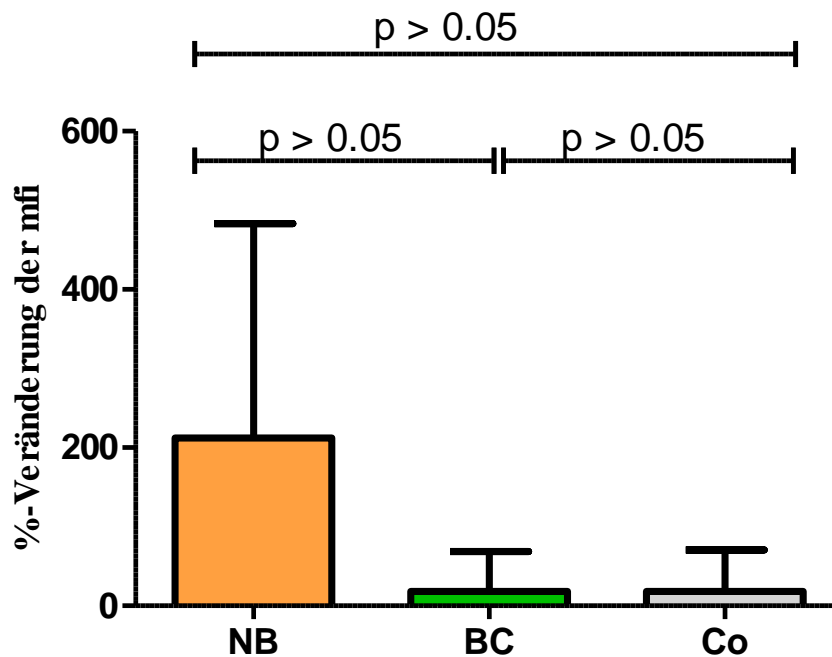


Abb. 25: Prozentuale Veränderung der MHC Klasse II-Expression nach Valproinsäure-Stimulation

Bcl-2: Alle stimulierten Neuroblastomzelllinien und ebenso alle stimulierten Bronchialkarzinomzelllinien zeigten eine Herabregulierung der bcl-2-Expression. Bei den Kontrollzelllinien führte die VPA-Stimulation zu keiner Expressionsveränderung (NB $-19.56 \pm 8.39\%$, BC $-28.28 \pm 16.28\%$, Co $-2.47 \pm 2.35\%$, $p > 0.05$; Abb. 26).

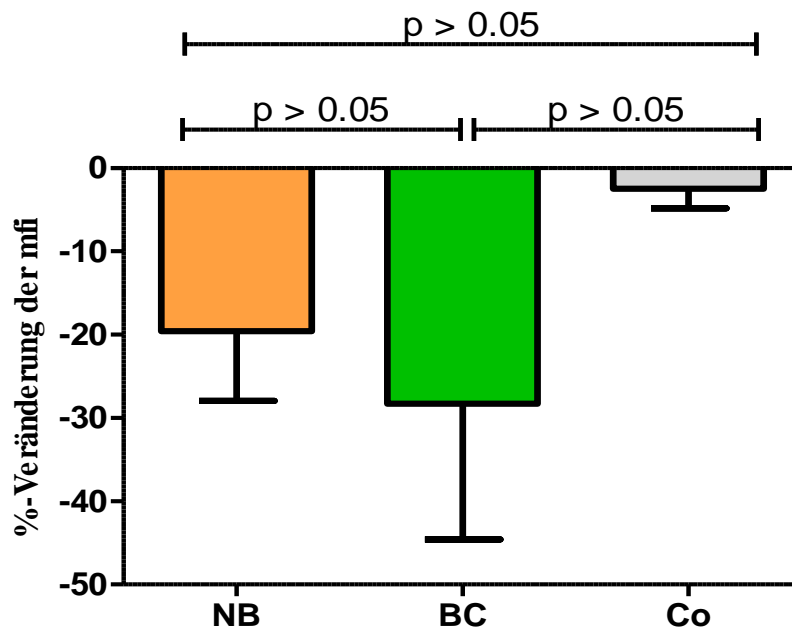


Abb. 26: Prozentuale Veränderung der bcl-2-Expression nach Valproinsäure-Stimulation

Werden diese Ergebnisse anhand der einzelnen Expressionsänderungen innerhalb der Zellreihen aufgeschlüsselt, zeigt sich ein z.T. sehr zelllinienspezifisches Expressionsverhalten (Tab. 8).

Tab. 8: Übersicht über die prozentuale Expressionsänderung aller gemessenen Proteine und Zelllinien nach Valproinsäure-Stimulation:

+/- keine Expressionsänderung, + geringe Expressionszunahme, ++ mittlere Expressionszunahme, +++ starke Expressionszunahme, - geringe Expressionsabnahme, - - mittlere Expressionsabnahme, - - - starke Expressionsabnahme

	NF	NCAM	HuD	Synaptotagmin	p75	MHC I	MHC II	bcl-2
SKN-SH	+/-	++	-	+/-	+++	+++	+++	- -
SH-SY5Y	- -	+	- - -	- -	++	++	++	- -
NMB	- - -	+/-	- - -	+++	++	+++	+	-
H460	- -	+/-	- -	-	+/-	+	+/-	-
A549	-	+++	- -	-	+	+	+/-	- - -
A510	+++	-	+/-	+++	+	++	+++	- - -
DK-MG	+/-	+++	+/-	+/-	+/-	+/-	-	+/-
HEK	-	++	- -	- -	+++	+/-	- -	+/-

4.3. Proteinexpressionsänderung der Neuroblastomzelllinien SKN-SH und SH-SY5Y unter Stimulation mit Trichostatin A (TSA) im Vergleich zur Stimulation mit VPA

Trichostatin A ist ein bereits seit langer Zeit bekannter HDAC-Inhibitor. Da sehr viele Arbeitsgruppen mit TSA arbeiten, sind die Eigenschaften und Wirkungen von TSA valide beschrieben und können daher zum Vergleich der Wirkungsweisen anderer HDAC-Inhibitoren herangezogen werden. Exemplarisch wurden daher in dieser Arbeit zwei Neuroblastomzelllinien (SKN-SH und SH-SY5Y) auf die Expressionsänderung verschiedener Proteine nach der Inkubation mit TSA untersucht und die Ergebnisse mit der Expressionsänderung derselben Proteine unter VPA-Stimulation verglichen.

4.3.1. Vergleich der Expressionsänderung neuronaler Proteine

NCAM: Die Neuroblastomzelllinien SKN-SH und SH-SY5Y zeigten unter der Stimulation mit VPA beide eine mäßige Hochregulation der NCAM-Expression. Unter dem Einfluss des Differenzierungsagens TSA jedoch kam es zu sehr differentem Expressionsverhalten: Die Zelllinie SKN-SH wies eine hohe Steigerung der NCAM-Expression auf, wohingegen bei der Zelllinie SH-SY5Y keine Veränderung des Differenzierungsverhaltens in der NCAM-Expression nachweisbar war. ($NB_{VPA} 38.4 \pm 20.2\%$, $NB_{TSA} 61.0 \pm 83.4\%$; Abb. 27).

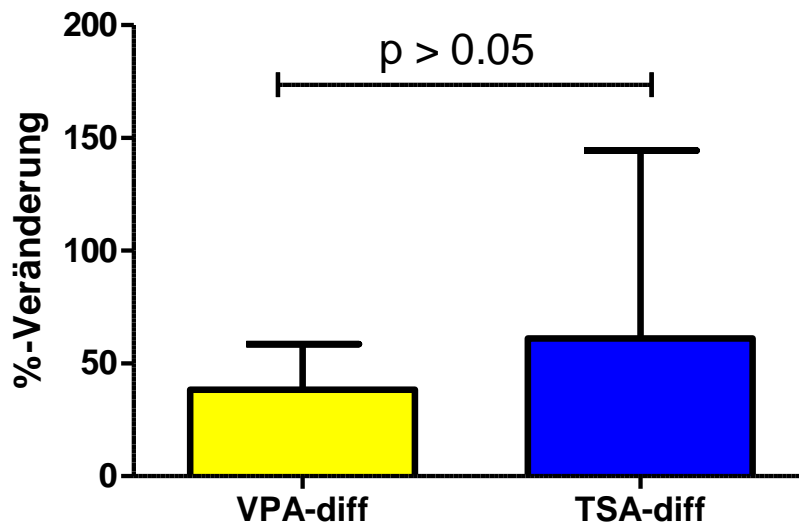


Abb. 27: Vergleich der NCAM-Expression der Neuroblastomzelllinien SKN-SH und SH-SY5Y unter dem Einfluss der Differenzierungsagenzien Trichostatin A und Valproinsäure

p-75: Die Stimulation mit TSA führte im Vergleich zu der Stimulation mit VPA bei beiden Neuroblastomzelllinien gleichermaßen zu einer ähnlich starken Zunahme der p75- Expression ($NB_{VPA} 204.1 \pm 67.5\%$, $NB_{TSA} 282.0 \pm 186.7\%$; Abb. 28).

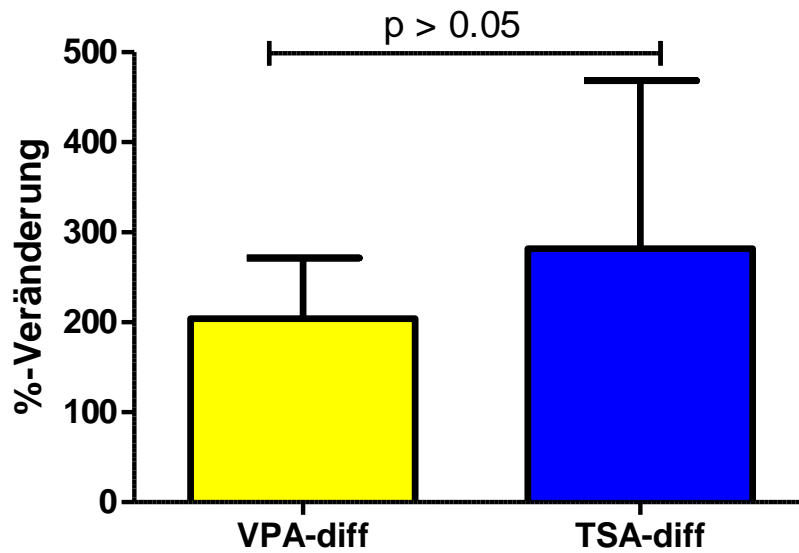


Abb. 28: Vergleich der p75-Expression der Neuroblastomzelllinien SKN-SH und SH-SY5Y unter dem Einfluss der Differenzierungsagenzien Trichostatin A und Valproinsäure

4.3.2. Vergleich der Expressionsänderung nicht-neuronaler Proteine

MHC Klasse I: Im Gegensatz zu dem Differenzierungsverhalten der Neuroblastomzelllinien SKN-SH und SH-SY5Y unter dem Einfluss von VPA zeigte sich unter der Stimulation mit TSA eine deutlich geringere MHC-Klasse I-Hochregulation. ($NB_{VPA} 334.9 \pm 72.6\%$, $NB_{TSA} 30.0 \pm 36.8\%$; Abb. 29)

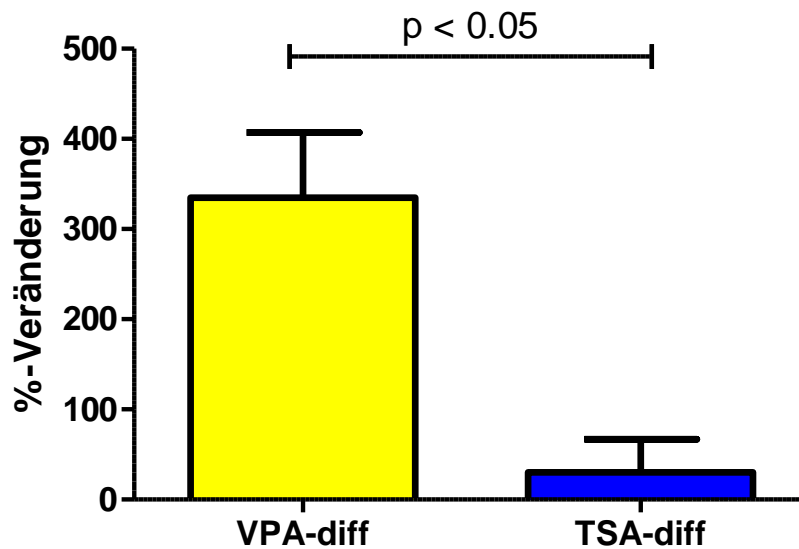


Abb. 29: Vergleich der MHC Klasse I-Expression der Neuroblastomzelllinien SKN-SH und SH-SY5Y unter dem Einfluss der Differenzierungsagenzien Trichostatin A und Valproinsäure

MHC Klasse II: Unter der Stimulation mit TSA zeigten die Neuroblastomzelllinien SKN-SH und SH-SY5Y ein annähernd gleiches MHC Klasse II-Expressionsverhalten wie unter der Stimulation mit VPA ($NB_{VPA} 293.0 \pm 328.4\%$, $NB_{TSA} 250.0 \pm 134.4\%$; Abb. 30).

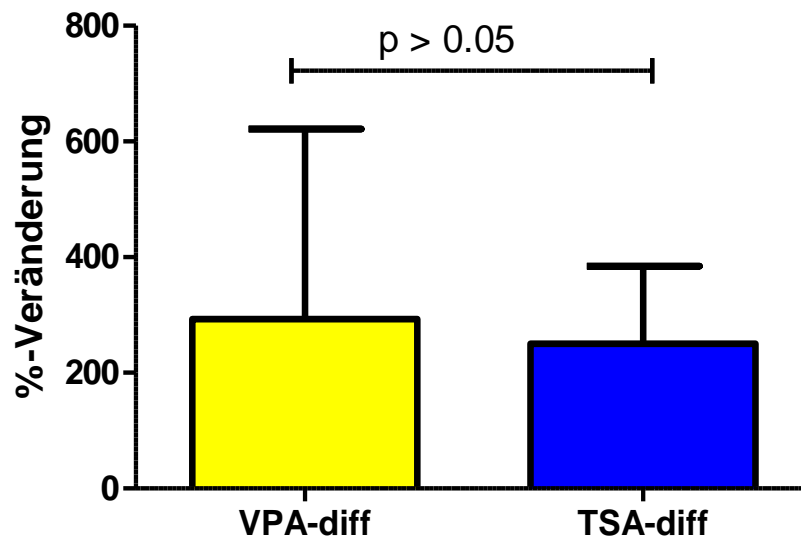


Abb. 30: Vergleich der MHC Klasse II-Expression der Neuroblastomzelllinien SKN-SH und SH-SY5Y unter dem Einfluss der Differenzierungsagenzien Trichostatin A und Valproinsäure

4.4. Expressionsänderungen von RT1-A nach VPA- und TSA-Stimulation in der Primärkultur von *Plexus Auerbach*-Neuronen

Die initial nur geringe RT1-A-Expression auf den Neuronen des *Plexus myentericus* (Plexus) zeigte unter dem Einfluss des Differenzierungsagens VPA eine Steigerung der RT1-A-Expression. Nach Stimulation mit TSA jedoch kam es zu einer Herabregulation der RT1-A-Expression (Abb. 31).

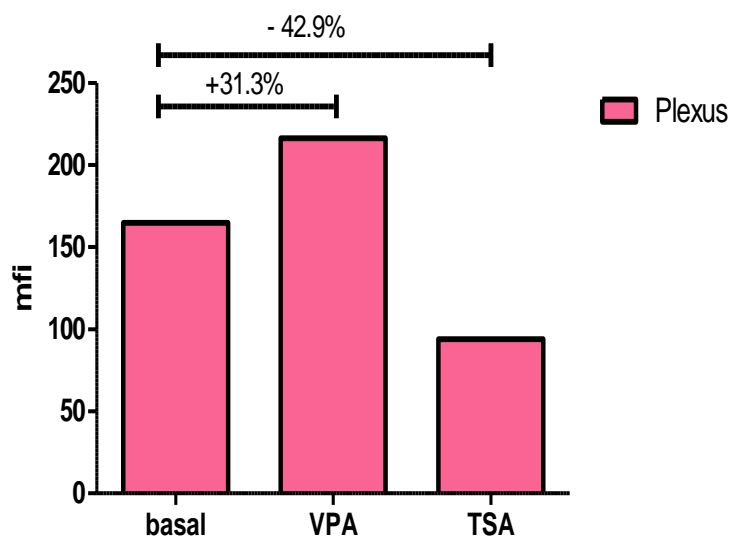


Abb. 31: Expressionsverhalten von *Plexus myentericus*-Zellen (Plexus) unter dem Einfluss der Differenzierungsagenzien VPA und TSA bezüglich ihrer RT1-A-Expression

5 Diskussion

5.1. Methodendiskussion

5.1.1. Wahl des Analyseverfahrens

Die Durchführung einer durchflusszytometrischen Untersuchung wurde in dieser Arbeit als Analyseverfahren gewählt, da sie den Vorteil bietet, nicht nur membranständige Oberflächenantigene, sondern auch, nach entsprechender Permeabilisierung der Zellmembran, intrazelluläre Antigene unter gleichen Versuchsbedingungen zu untersuchen. Durch eine Eichung und Kalibrierung der Fluoreszenzsignale kann mit der Durchflusszytometrie eine hohe Reproduzierbarkeit erreicht werden. Zudem ermöglicht dieses Verfahren die Untersuchung einer Vielzahl von Zellen, so dass hierbei nicht nur qualitative, sondern auch quantitative Analysen und statistische Auswertungen möglich sind. Zusätzlich kann parallel zu den Messreihen eine Lebend-Tod-Analyse durchgeführt werden. Die Durchflusszytometrie ist mit etwa 500 bis 4.000 gezählten Zellen pro Sekunde zudem sehr schnell durchführbar. Ein weiterer Vorteil der Durchflusszytometrie ist, dass die Zellen den Laser sehr schnell passieren und damit die Belichtungszeiten entsprechend kurz sind. Dies führt zu einem nur geringen Ausbleichen der Fluoreszenz über die Zeit, was der Messgenauigkeit förderlich ist.

Der Nachteil der Durchflusszytometrie besteht im Wesentlichen darin, dass nur Einzelzellmessungen möglich sind, die Zellen also aus ihrem Zell-Zell-Verband herausgelöst und in Suspension gebracht werden müssen. Zudem ist die Anschaffung eines FACS-Durchflusszytometers kostenintensiv.

5.1.2 Vergleichbarkeit von Valproinsäure (VPA) und Trichostatin A (TSA)

VPA und TSA unterscheiden sich in ihrem strukturellen Aufbau grundlegend. So handelt es sich bei VPA um eine kurzkettige aromatische Fettsäure und bei TSA um ein Hydroxamsäurederivat (Kap. 1.2). Die Inhibierungspotenz und der Wirkmechanismus sind für die jeweiligen HDACs unterschiedlich. Göttlicher et al. (2001) wiesen nach, dass radioaktiv markiertes VPA durch TSA aus seiner HDAC-Bindungsstelle kompetitiv verdrängt werden

kann und postulierten die Bindung von VPA und TSA trotz struktureller Unterschiede am selben katalytischen Zentrum. Des Weiteren konnte im Rahmen von Inhibierungsstudien nachgewiesen werden, dass VPA die HDAC-Klasse-I-Isoformen 1 und 2 mit einer IC_{50} von 0.7-1.0 mmol/L inhibiert, aber keinen Einfluss auf die Funktion der HDAC-Klasse-II-Isoformen 6 und 10 besitzt. Im Gegensatz dazu konnte für TSA mit einer IC_{50} von 0.5-50nmol/L insgesamt eine deutlich stärkere Hemmung gezeigt werden - sowohl für die HDAC-Klasse I, als auch für die HDAC-Klasse II. Die Funktion der HDAC-Klasse III konnte weder durch TSA noch durch VPA beeinflusst werden (Gurvich et al. 2004). Die Vergleichbarkeit von VPA und TSA bezogen auf die HDAC-Klasse I ist durch die Verwendung unterschiedlicher Konzentrationen gegeben. Durch die differenzierte Fähigkeit zur Inhibierung der HDAC-Klasse I und II von TSA und VPA ist es zudem möglich, den Wirkmechanismus der HDAC-Inhibition genauer zu untersuchen. So zeigt zum Beispiel Valproinsäure (VPA) bei 0.7-1 mM eine Hemmung von 50% der Enzymtätigkeit der HDACs 1-3. Bei einer höheren Konzentration von 1 mM bis 1,5 mM zeigt sich eine IC_{50} -Hemmung der HDAC-Klasse II (HDAC 4, 5 und 7 = HDAC-Subklasse I). Bei *in-vivo*-Versuchen an haematopoetischen Leukämie-Zelllinien konnte die Aktivitätsveränderung im Zeitverlauf gezeigt werden. Die Histondeacetylase-Aktivität war nach 3 Stunden bis 72 Stunden deutlich vermindert, wohingegen die Hemmung durch Trichostatin A mit einer Wirkdauer bis 24 Stunden deutlich kürzer ausfiel (Gurvich et al. 2004).

5.1.3 Heterogenität der Zelllinien

Bei der Beurteilung der Wirkung der HDAC-Inhibitoren ist zunächst eine genaue Charakterisierung der einzelnen Zelllinien notwendig, da die Zelllinien eine ausgeprägte Heterogenität aufweisen. Wie in den vorangegangenen Abschnitten beschrieben (Kap. 4.1.2, Tab. 7), zeigte sich bereits bei der basalen Expression sowohl der neuronalen als auch der nicht-neuronalen Proteine ein differentes Expressionsverhalten der einzelnen Zellreihen. Verantwortlich hierfür ist unter anderem die Regulation der Transkription durch die Histonmodifikation. Dieser epigenetische Code ist für jede Zelle spezifisch festgelegt und bestimmt, welche Proteine transkribiert werden. Für die Neuroblastomzelllinien BE(2)-C, SH-SY5Y, Kelly, SH-EP, WAC-2 und SK-N-BE konnte gezeigt werden, dass hier die HDAC 8 eine entscheidende Rolle spielt. Eine hohe Expressionsrate von HDAC 8 korrelierte negativ mit der Überlebenswahrscheinlichkeit. Des Weiteren zeigte sich eine Herabregulation der HDAC-8-Expression bei Eintritt in das 4s-Stadium, welches häufig mit einer Spontanremission und

einer deutlich besseren Prognose einherging. Die HDAC 8 scheint somit auf den Differenzierungsgrad der Neuroblastomzelllinien direkt Einfluss zu nehmen, wohingegen die Höhe der HDAC-8-Expression keinen Effekt auf die Apoptoserate der Zellen hatte. Es konnte gezeigt werden, dass es durch eine verminderte HDAC-2-Aktivität zu einer Zunahme der Apoptoserate der Neuroblastomzelllinien kam (Oehme et al. 2009). Im Gegensatz zu den Neuroblastomen konnte für die Tumorgenese des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms bisher noch keine einzelne Histondeacetylase verantwortlich gemacht werden. Allerdings wurden in den letzten Jahren zunehmend spezifischere Histondeacetylaseinhibitoren, wie beispielsweise KD5170, für die Therapie des nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinoms entwickelt. KD5170 führt bereits im nanomolaren Bereich zu einer signifikanten Reduktion des Tumorstwachstums in einer Colonkarzinomzelllinie (HCT-116), einer Prostatakarzinomzelllinie (PC-3) sowie der nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinomzelllinie H460, die auch in der vorliegenden Arbeit verwendet wurde. KD5170 hemmt insbesondere die HDAC 1 und 3, die der HDAC-Klasse I (Tab. 1) zugeordnet werden (Hassig et al. 2008). Zusammenfassend besteht also eine große Heterogenität zwischen den einzelnen Zelllinien, selbst innerhalb einer Tumorentität, sodass die Wirksamkeit einzelner HDAC-Inhibitoren nur für die jeweils untersuchte Zelllinie bewiesen werden kann.

5.2. Wirkung von Histondeacetylaseinhibitoren auf die Proteinexpression

Ob ein Protein exprimiert wird, hängt von der Verfügbarkeit der zu transkribierenden DNA ab. Die DNA ist um basische Proteine, die Histone, gewunden. Bereits seit etwa 40 Jahren ist bekannt, dass eine Modifikation der Histonreste zu einer Funktionsänderung der Histone führt, jedoch war der molekulare Mechanismus jahrzehntelang unklar. 1996 gelang es einzelnen Arbeitsgruppen erstmalig, Histonacetyltransferasen und Histondeacetylasen zu isolieren und zu charakterisieren (Brownell et al. 1996, Taunton et al. 1996). Es zeigte sich, dass eine Acetylierung des Lysinrestes der Histone zu einer Auflockerung der Chromatinstruktur führt, wodurch eine Transkription ermöglicht wird. Die Histondeacetylasen machen diesen Prozess rückgängig und überführen das Chromatin zurück in eine dichter gepackte Form, sodass Transkriptionsfaktoren und andere DNA-bindende Regulatoren keinen Zugriff mehr auf die DNA haben (Grunstein 1997, Kuo & Allis 1998). Seit einigen Jahren wird ein „Histon-Code“ postuliert, der besagt, dass die Transkription eines Gens vom Zusammenspiel der acetylierten und deacetylierten Histone abhängt (Cheung et al. 2000, Turner 2000, Jenuwein & Allis 2001).

5.2.1. Einfluss des Histondeacetylaseinhibitors Valproinsäure auf die Expression von neuronalen Proteinen

HDAC-Inhibitoren sind seit mehreren Jahren zunehmend der Schwerpunkt experimenteller Studien. Bisher konnte durch verschiedene Arbeitsgruppen sowohl *in vitro* als auch z.T. *in vivo* am Tiermodell gezeigt werden, dass der Einsatz von HDAC-Inhibitoren zu einer Ausdifferenzierung verschiedener neuronaler Zellen führt (Kim et al. 2009, Cinatl et al. 1996, O'Malley et al. 1993). Allerdings ergaben sich Unterschiede bezüglich der Wirkung von HDAC-Inhibitoren auf die Zellproliferation von Neuronen: Durch die Behandlung von Neuroblastomzellen mit VPA kam es zu einer Proliferationshemmung (Cinatl et al. 1996), wohingegen TSA eine proliferationsfördernde Wirkung aufwies (Kim et al. 2009). Die in dieser Arbeit vorgestellten Versuche konnten zeigen, dass der Einfluss von HDAC-Inhibitoren auf die Ausdifferenzierung von Tumorzelllinien unterschiedlich stark ist und dass diese ursprünglich neuronalen Tumorzellen nicht zwangsläufig eine typisch neuronale Differenzierung unter dem Einfluss von HDAC-Inhibitoren vornehmen.

Das Neurofilamentprotein (NF) ist ein Strukturprotein und ein Marker für neuronale Stamm- oder Vorläuferzellen. Der Verlust der NF-Expression fungiert entsprechend als Indikator einer Ausdifferenzierung. In den hier vorgestellten Versuchen wurde NF zunächst in allen Neuroblastomzelllinien in hohem Maß exprimiert. Im Sinne einer Differenzierungsinduktion führte die Behandlung mit VPA dann bei den Neuroblastomzelllinien NMB und SH-SY5Y zu einer geringeren NF-Expression. Die Neuroblastomzelllinie SKN-SH zeigte unter der Behandlung mit VPA keine Veränderung des NF-Expressionsmusters. Die Auslösung einer Differenzierung durch VPA scheint also je nach behandeltem Zelltyp unterschiedlich stark ausgeprägt zu sein. Auch bei den neuroendokrin differenzierten Bronchialkarzinomzelllinien kam es zu einer Veränderung des Phänotyps unter der Behandlung mit VPA. Die Bronchialkarzinomzelllinien H460 und A549 zeigten eine Verminderung der initial bereits nur gering vorhandenen NF-Expression. Eine Ausnahme stellte die Bronchialkarzinomzelllinie A510 dar: Basal wies sie eine minimale NF-Expression auf. Im Zuge der Behandlung mit VPA konnte eine deutliche Steigerung der NF-Expression, also eine Differenzierung der Zellen in Richtung neuronaler Stamm- bzw. Vorläuferzellen, beobachtet werden. Die Annahme, dass die Bronchialkarzinomzelllinie A510 auf die Behandlung mit VPA mit einer Entdifferenzierung reagiert, wird auch durch die verminderte NCAM-Expression unterstützt. NCAM wird physiologisch auf differenzierten Neuronen und in der Skelettmuskulatur exprimiert (Cremer et al. 2000). Allerdings steigt die NCAM-Expression im Sinne eines „regenerativen“ Expressions-

musters bei neuronalen Zellen auch durch die Einwirkung eines Traumas. Es konnte gezeigt werden, dass eine Dissoziation retinaler Neurone von Makaken zum gleichen Expressionsmuster führte, welches die Zellen nach einem traumatischen Ereignis aufwiesen (O'Malley & P.R. Mac Leish 1993). Bei den hier untersuchten Neuroblastomzellen reagierten die Zelllinien SH-SY5Y und SKN-SH auf die VPA-Behandlung mit einer erhöhten NCAM-Expression, also im Sinne eines „regenerativen“ Expressionsmusters. Da sowohl die mit VPA behandelten Zellen als auch die unbehandelten Zellen, wie im Methodenteil beschrieben, dissoziiert wurden, kann bei der NCAM-Expressionssteigerung von einer spezifischen VPA-Wirkung ausgegangen werden. Diese NCAM-Expressionssteigerung ist auch aus einem zweiten Grund besonders wichtig, da die MHC-Komplex-unabhängige Immunogenität der Neuroblastomzellen u.a. durch NCAM reguliert wird. Es konnte gezeigt werden, dass eine erhöhte NCAM-Expression mit einer erhöhten Lyserate durch lymphokin-aktivierte Killerzellen einhergeht. In diesen Versuchen wurde bei den Neuroblastomzelllinien UKF-NB2 und UKF-NB-3 ebenfalls durch die Inkubation der Zellen mit VPA eine Expressionssteigerung von NCAM ausgelöst. Durch diese gesteigerte NCAM-Expression wurde die Sensitivität der Zellen gegenüber lymphokin-aktivierten Killerzellen deutlich gesteigert (Cinatl et al. 1996). Ein weiterer Marker der Plastizität und Differenzierung neuronaler Zellen ist das Synaptotagmin, ein neuronales, präsynaptisches, vesikuläres Membranprotein, welches kalziumabhängig für die schnelle Freisetzung von Neurotransmittern zuständig ist. Synaptotagmin ist ein hochkonserviertes Membranprotein, das in verschiedenen Isoformen vorliegt. Es wurde hauptsächlich in Neuronen nachgewiesen, allerdings exprimieren auch Gliazellen bestimmte Synaptotagmin-Isoformen (Glavan et al. 2009). Im Rahmen dieser Arbeit fand sich ein sehr inhomogenes Verhalten der einzelnen Zellreihen bezüglich ihrer Synaptotagmin-Expression. Das Vorliegen eines zellartspezifischen Expressionsmusters wurde bereits von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (Glavan et al. 2009). Korrespondierend hierzu konnte auch bei den hier gezeigten Messungen keine Einheitlichkeit festgestellt werden. Die Neuroblastomzelllinie NMB wies eine Hochregulation der Expression von Synaptotagmin auf, wohingegen die Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y eine leichte Herabregulation zeigte und die Neuroblastomzelllinie SKN-SH nicht mit einer Synaptotagmin-Expressionsänderung reagierte (Tab. 8).

Zusammenfassend scheinen die Neuroblastomzelllinien SKN-SH und SH-SY5Y sowie die Bronchialkarzinomzelllinien H460 und A549 VPA-induziert einen niedrigeren neuronalen Differenzierungsgrad zu erreichen. Dem entsprechend konnte eine Verminderung der HuD-Expressionsrate nach der Behandlung mit VPA erwartet werden. Diese Annahme bestätigte sich bei sämtlichen Neuroblastomzelllinien, aber auch die Bronchialkarzinomzelllinien H460

und A459 wiesen eine deutlich verringerte Expression von HuD-Antigenen auf. Interessant war der Befund, dass die Bronchialkarzinomzelllinie A510 eine Steigerung der NF-Expression zeigte, was als Induktion einer stärkeren neuronalen Differenzierung interpretiert werden kann.

HDAC-Inhibitoren, wie TSA, wurde bisher eine neuroprotektive Wirkung unterstellt (Camelo et al. 2005). In jüngster Zeit wurde sogar eine spezifisch neuronale, antiapoptotische Wirkung von HDAC-Inhibitoren postuliert, wobei diese Wirkung bei SH-SY5Y-Zellen nicht belegt werden konnte (Uo et al. 2009). In den hier gezeigten Versuchen konnte eine Hochregulation der p-75-Expression in allen untersuchten Neuroblastomzelllinien und etwas weniger ausgeprägt in allen Bronchialkarzinomzelllinien nachgewiesen werden. P-75 wird der großen Gruppe der Tumornekrosefaktor-Rezeptoren-Superfamilie zugeordnet und spielt als Neurotrophinrezeptor eine wichtige Rolle bei der Apoptose-Regulation. Frühere Untersuchungen zeigten bei der histologischen Aufarbeitung von Neuroblastomzellen (UKF-NB-3) nach der Behandlung mit VPA deutliche Apoptosezeichen, wie beispielsweise sehr kleine, verdichtete Zellkerne, eine hyperdense Zellkernmembran und Apoptose-Körperchen (Cinatl et al. 1997). Allerdings wurden in den letzten Jahren auch Ergebnisse veröffentlicht, die belegen, dass VPA zumindest in Neuroblastomzelllinien eine antiapoptotische Wirkung besitzt. Verschiedene antiapoptotische Signalkaskaden werden durch VPA initiiert. So konnte gezeigt werden, dass durch die Inkubation mit VPA (5 mM) eine Induktion des „Heat-Shock-Proteins“ (Hsp) 70 ausgelöst wird. Heat-Shock-Proteine gehören zu der heterogenen Gruppe zellprotektiver Proteine, die als molekulare Chaperone arbeiten und dabei an Vorgängen wie der Faltung von Proteinen, Signaltransduktionen oder der Renaturierung gefalteter Proteine und deren proteolytischem Abbau, beteiligt sind. Außerdem konnte gezeigt werden, dass VPA den Protein-kinase-B-Signalweg aktivieren kann, dem ebenfalls eine protektive antiapoptotische Wirkung zugeschrieben wird (Pan et al. 2005). Die erhöhte p-75-Expression kann also ein Hinweis für eine verstärkte induzierte Apoptose als spezifische Folge der VPA-Behandlung sein. Auch andere Arbeitsgruppen setzten sich mit diesen gegenläufigen Ergebnissen auseinander und konnten zeigen, dass die VPA-behandelten Neuroblastomzelllinien in zwei Populationen zerfallen: Die erste Population löst sich aus dem Zell-Zell-Kontakt und reagiert zu einem sehr hohen Prozentsatz mit der Einleitung der Apoptose. Die zweite Population erhält den Zell-Zell-Kontakt und zeigt keine eingeschränkte Lebensfähigkeit (Stockhausen et al. 2005). Die differierenden Ergebnisse können demnach durch ein Überwiegen einer der beiden Populationen während der Messung begründet sein. Somit stehen diese Ergebnisse also nicht in einem Gegensatz, sondern ergänzen sich inhaltlich.

5.2.2. Einfluss des Histondeacetylaseinhibitors Valproinsäure auf die Expression nicht-neuronaler Proteine

Der Genregulation, speziell der Apoptose und deren therapeutischer Induktion, kommt eine immer wichtigere Rolle in der Behandlung von malignen Erkrankungen zu. Für den HDAC-Inhibitor VPA konnte, wie bereits oben diskutiert, eine proapoptotische Wirkung gezeigt werden. Diese proapoptotische Wirkung von HDAC-Inhibitoren, die bereits von anderen Arbeitsgruppen beschrieben wurde (Cinatl et al. 1996, Cinatl et al. 1997, Magner et al. 2000, Stockhausen et al. 2005), setzt sich unseres Erachtens aus mindestens zwei Komponenten zusammen: Zum einen führte VPA in unseren Versuchen zur Induktion der Transkription von Apoptose fördernden Faktoren, wie dem p-75-Protein, und zum anderen zur Hemmung von antiapoptotischen Genen, wie bcl-2. Die unstimulierten Neuroblastomzelllinien präsentierten basal als postmitotische Neurone eine hohe bcl-2-Expression. Diese hohe bcl-2-Expression geht einher mit einer schlechteren Tumorprognose und korrelierte mit einer Chemoresistenz der bcl-2-exprimierenden Neuroblastome gegen Cisplatin- und Etoposid-induzierter Zytotoxizität (Dole et al. 1994). Wir konnten zeigen, dass alle Neuroblastomzelllinien mit einer verminderten bcl-2-Expression auf die VPA-Behandlung reagierten. Da die Kontrollzelllinien keine bcl-2-Expressionsveränderung aufwiesen, könnte man vermuten, dass es sich hierbei um ein spezifisch neuronales bcl-2-Expressionsverhalten unter dem Einfluss von VPA handelt.

Gegen die proapoptotische Wirkung von VPA sprechen Ergebnisse anderer experimenteller Forschungsarbeiten. In diesen wurde für VPA ein protektiver und antiapoptotischer Effekt postuliert. Nach einer kombinierten Inkubation von SH-SY5Y-Neuroblastomzellen mit VPA (5 mMol) und Rotenon (5 μ Mol) konnte eine erhöhte Expression von bcl-2 festgestellt werden. Rotenon ist ein Insektizid und Pestizid, das an der mitochondrialen Membran wirkt, indem es den spannungsabhängigen Transport blockiert und dadurch in der Lage ist, die Apoptoseeinleitung der Zelle zu induzieren. Allerdings konnte neben der erhöhten Expression von bcl-2 auch eine Induktion von Hsp 70 festgestellt werden (Pan et al. 2005). Heat-Shock-Proteine arbeiten als Chaperone und sind somit für die Aufrechterhaltung der Homöostase der Zelle verantwortlich. Für Hsp 70 konnte eine antineurodegenerative Wirkung nachgewiesen werden (Cummings et al. 2001). In weiterführenden Versuchen wurde dieses Hsp 70 inhibiert, wodurch sich nicht nur der vorbeschriebene antiapoptotische Effekt für VPA deutlich reduzierte, sondern auch die Expression von bcl-2 abnahm (Pan et al. 2005). Somit scheint es sich hiermit um zwei differente Wirkmechanismen der VPA zu handeln. Einerseits die in unserer

Arbeit beschriebene Absenkung der Expression des antiapoptotischen bcl-2, andererseits und gegenläufig hierzu die Erhöhung der Expression von Hsp 70, was wiederum zu einer erhöhten Expression von bcl-2 führt. Hierbei ist jedoch der Zeitpunkt der jeweiligen Messung zu berücksichtigen, da die Erhöhung von Hsp 70 und bcl-2 innerhalb von maximal 24 Stunden festgestellt wurde, wohingegen unsere Messungen nach 48 Stunden durchgeführt wurden. Somit besteht unsere Annahme weiterhin, dass VPA in seiner Funktion als HDAC-Inhibitor eine proapoptotische Wirkung aufweist. Deutlich wird hierdurch jedoch auch, dass der Wirkmechanismus von VPA nicht auf seine Funktion als HDAC-Inhibitor beschränkt bleibt, sondern, wie oben beschrieben, durch die Induktion von Hsp 70 zu partiell sogar gegensätzlichem Expressionsverhalten der Zielzelle führen kann.

In somatischen, nicht-neuronalen Zellen führt eine maligne Entdifferenzierung häufig zu einer herabgesetzten Expression von MHC Klasse I-Molekülen an der Zelloberfläche. Durch diese MHC Klasse I-Minderexpression werden diese Zellen zu Zielen von natürlichen Killerzellen (NK-Zellen). Höglund et al. (1991) nehmen an, dass dies ein Schutzmechanismus vor spontaner Tumorzellmutation ist. Bei den postmitotischen neuronalen Zellen kann physiologisch keine oder eine nur minimale MHC Klasse I-Proteinexpression an der Zelloberfläche nachgewiesen werden. Dies zeigte sich auch in unseren Versuchen mit der Primärkultur der Neurone des *Plexus myentericus*. Umso überraschender war es, dass traumatisierte neuronale Zellen eine MHC Klasse I-Hochregulation zeigten. Es wurde daher angenommen, dass diese gesteigerte Expression von MHC-Klasse I die neuronalen Zellen vor einer Lyse durch NK-Zellen schützt (O'Malley & MacLeish 1992). Es konnte gezeigt werden, dass humane Retinaneuronen nach ihrer Dissoziation im Sinne einer Regeneration für ca. zwei Wochen MHC Klasse I-Antigene an ihrer Zelloberfläche exprimierten. Hieraus ließ sich schlussfolgern, dass die Präsentation der MHC-Klasse I eine Funktion bei der Zellregeneration übernimmt (O'Malley & MacLeish 1992). Auch andere Arbeitsgruppen konnten eine zum Beispiel durch Interferon γ oder durch Blockade der elektrischen Aktivität induzierte MHC-I-Expression auf neuronalen Zellen nachweisen (Neumann et al. 1995, Darnell 1998). Bemerkenswert ist, wie in dieser Arbeit gezeigt werden konnte, dass auch eine Inkubation mit VPA bei den Neuroblastomzelllinien eine signifikante Steigerung der MHC-I-Expression zur Folge hat. Wie bereits oben diskutiert, handelt es sich unseres Erachtens nicht um ein rein „regeneratives“ Expressionsmuster, sondern um eine spezifische Expressionsänderung durch das Differenzierungsagens VPA, da sowohl die nicht mit VPA behandelten Zellen als auch die mit VPA behandelten Zellen durch eine Dissoziation traumatisiert wurden. Hierbei zeigte sich eine signifikant stärkere Hochregulation der MHC Klasse I-Expression bei den VPA-

behandelten Neuroblastomzellen. Auch die Zellen des *Plexus myentericus* aus der juvenilen Ratte zeigten eine Hochregulation des RT1-A-Komplexes, was dem humanen MHC Klasse I-Komplex entspricht. Die eigentliche Rolle des MHC Klasse I-Komplexes auf neuronalen Zellen ist noch weitgehend unklar. Zunächst war davon ausgegangen worden, dass der MHC Klasse I-Komplex auf Neuronen die gleiche antigenpräsentierende Funktion besitzt wie auf nicht-neuronalen Zellen. Damit wurde auch der immunprivilegierte Status von Neuronen begründet, auf denen man keine MHC Klasse I-Expression nachweisen konnte. Allerdings konnte gezeigt werden, dass Neuronen, die mit einem neurotrophen Virus infiziert wurden, zwar eine erhöhte MHC Klasse I-Expression zeigten, allerdings dennoch keiner verstärkten neuronalen Zytotoxizität unterlagen (Darnell, 1998). Des Weiteren wurde dem MHC Klasse I-Komplex eine wichtige Rolle in der Ausbildung der neuronalen Plastizität zugeschrieben (Huh et al. 2000). Dennoch, bei aller Diskussion über die Aufgaben des MHC Klasse I-Komplexes auf neuronalen Zellen, ist eine immunologische Funktion deutlich ersichtlich: So führen zum Beispiel Immunreaktionen gegen onkoneurale Antigene, die für paraneoplastische neurologische Erkrankungen verantwortlich gemacht werden, nur bei den Neuronen zu einem Zelluntergang, bei denen sie gemeinsam mit MHC Klasse I-Molekülen präsentiert werden (Corriveau et al. 1998) In unserer Arbeit konnte gezeigt werden, dass die MHC Klasse I-Expression durch Histondeacetylasen kontrolliert wird und eine Hemmung der HDACs zu einer gesteigerten MHC Klasse I-Expression führt. In den letzten Jahren gelang es einigen Arbeitsgruppen, experimentell eine MHC Klasse I-Expression auf neuronalen Zellen z.B. durch Verletzung, Zytokinbehandlung, elektrische Deprivation oder Infektion zu induzieren (O'Malley et al. 1993, Neumann et al. 1995, Darnell 1998, Forster et al. 2002). Bereits 1999 wurde beschrieben, dass Zellen, die mit dem proonkogenen Adenovirus Typ 12 transformiert wurden, eine deutlich verminderte Expression von MHC Klasse I-Molekülen aufwiesen. Es konnte des Weiteren gezeigt werden, dass diese Herabregulation der MHC Klasse I-Expression durch hohe Bindungsaktivität eines Transkriptionsrepressors (Chicken ovalbumin upstream promotor-transcription factor COUP-TF) ausgelöst wird und dieser COUP-TF als aktivierender Ligand an die Histondeacetylase bindet (Smirnov et al. 2000). Wenn also eine Malignisierung der Zelle u.a. durch eine HDAC-regulierte Unterdrückung der MHC-I-Expression ausgelöst wird, so wäre es ebenfalls denkbar, dass eine VPA-induzierte Normalisierung der MHC Klasse I-Expression zu einer Transformation der Zellen in einen benigneren Phänotyp führt. Mit dem Nachweis, dass die VPA-Behandlung von Neuroblastomzellen eine gesteigerte MHC Klasse I-Expression zur Folge hat, kann der Wirkmechanismus der VPA in der Therapie des Neuroblastoms detaillierter beschrieben werden.

VPA wird in der Neuroblastomtherapie bereits seit längerem in Kombination mit anderen Medikamenten eingesetzt. Unter der Therapie mit VPA zeigt sich der beschriebene Effekt der Transformation eines Neuroblastoms in ein benignes Ganglioneurom.

Eine weitere Möglichkeit zu verhindern, dass sich Tumore der immunologischen Erkennung entziehen, ist eine Modulation der MHC Klasse II-Expression. Der MHC Klasse II-Komplex wird physiologisch auf immunkompetenten Zellen exprimiert. Nicht-hämatopoetische Zellen präsentieren unter normalen Umständen keine oder nur in einem sehr geringen Maß MHC Klasse II-Moleküle. Allerdings kommt es auch bei nicht-immunkompetenten Zellen zu einer Induktion von MHC II (und MHC I) durch die Gabe von Interferonen (Magner et al. 2000). Diese Induzierbarkeit des MHC Klasse II-Komplexes und die damit verbundene höhere Tumorummunogenität wird schon seit langem in der Therapie verschiedener maligner Tumore, wie dem malignen Melanom, ausgenutzt (Fujii et al. 2000). Bei der humanen Neuroblastomzelllinie SK-N-MC war die Induktion einer MHC Klasse II-Expression durch eine Interferon (IFN) γ -Gabe jedoch nicht möglich, wohingegen nach einer Behandlung mit TSA (100 nM) eine MHC Klasse II-Expressionssteigerung um das 108-fache nachgewiesen werden konnte (Magner et al. 2000). In unseren Versuchen konnten wir zeigen, dass ein ähnlicher Effekt auf die MHC Klasse II-Expression durch die Behandlung mit VPA erreicht werden kann. Bei der Neuroblastomzelllinie SKN-SH konnten wir einen Anstieg der MHC Klasse II-Expression um 500% nachweisen. Bei den anderen beiden Neuroblastomzelllinien (SH-SY5Y und NMB) zeigte sich allerdings nur eine moderate Zunahme der MHC-Klasse-II-Expression um etwa 50%.

Sowohl den Neuroblastomen als auch den ebenfalls neuroendokrin differenzierten, kleinzelligen Bronchialkarzinomen wird unterstellt, einen bestimmten neuroendokrinen, tumorspezifischen Mechanismus der Hemmung der MHC Klasse II-Expression zu besitzen. Und zwar sind diese neuroendokrinen Tumore in der Lage, durch bestimmte, den neuroendokrinen Zellen vorbehaltene Transkriptionsfaktoren (N-myc, HASH-1) die Induktion des Klasse-II-Transaktivators (Class II Transactivator – CIITA) zu verhindern. Dieser CIITA ist jedoch essenziell notwendig, um über den IFN γ -Signalweg eine MHC Klasse II-Expression zu erreichen (Yazawa et al. 2002). Wie bereits für TSA von anderen Arbeitsgruppen beschrieben (Magner et al. 2000), konnten wir zeigen, dass auch der HDAC-Inhibitor VPA in der Lage ist, eine MHC Klasse II-Expression zu induzieren. Hierdurch werden neuroendokrine Tumore, die ansonsten der Erkennung durch das Immunsystem entgehen, für immunkompetente Zellen sichtbar gemacht und sind damit einer Therapie deutlich besser

zugänglich. Dass VPA durch Inhibition am HDAC-Komplex zu einer Transformation von Neuroblastomen in einen benigneren Phänotyp beiträgt, ist schon sehr lange bekannt. Für diese hochkomplexen und wahrscheinlich zu einem gewissen Teil auch ausschließlich neuroendokrinen Zellen vorbehaltenen Regulationsmechanismen konnte diese Arbeit punktuell zeigen, welche Proteinexpressionsänderungen vorgenommen werden. Da es sich hierbei aber nur um einen Nachweis auf Proteinebene handelt, kann diese Arbeit der Komplexität der Vorgänge nicht gerecht werden. Bereits die HDAC liegt in vier verschiedenen Isoformen vor, die wiederum durch aktivierende und inaktivierende Liganden in ihrer Wirkung beeinflusst werden. Des Weiteren nehmen nicht nur die HDACs, sondern auch andere Transkriptionsfaktoren Einfluss auf die Transkription. Zusätzlich haben weitere Faktoren einen Einfluss darauf, ob das Protein seine Funktion erfüllt und zum Beispiel an der Zelloberfläche exprimiert wird oder nicht. Durch das medikamentöse Eingreifen wird dieser Prozess noch komplexer, da die HDAC-Inhibitoren nicht nur unterschiedlich stark wirken, sondern sich zudem in ihrer Wirkungsweise unterscheiden. Um eine gezielte medikamentöse Transkriptionsmodulation vornehmen zu können, wird eine spezifische Untersuchung des Zielgewebes und Klärung der Haupteinflussfaktoren sowie die Austestung eines bestimmten HDAC-Inhibitors notwendig sein. Diese Arbeit zeigt insbesondere auf, dass eine Pauschalaussage über HDAC-Inhibitoren nicht getroffen werden kann, sondern dass jeder HDAC-Inhibitor im Einzelnen und in Bezug auf das Zielgewebe charakterisiert werden muss.

5.3. Einfluss des Histondeacetylaseinhibitors Trichostatin A auf die Proteinexpression

5.3.1 Einfluss des Histondeacetylaseinhibitors Trichostatin A auf die Expression neuronaler Proteine

Bei Ischämieversuchen an zentralen Neuronen der Ratte (Subventrikuläre Zone und *Gyrus dentatus*) konnte nachgewiesen werden, dass die Zellproliferation unter dem Einfluss von TSA innerhalb von 14 Tagen deutlich zunimmt. Allerdings wurden keine typischen neuronalen Marker, wie das NeuN- und Hu-Protein, auf diesen Zellen nachgewiesen. Im Gegenteil konnte das Polysialylsäure assoziierte neuronale Zellerkennungsmolekül (PSA-NCAM-Polysialic acid-neural cell adhesion molecule) nachgewiesen werden. PSA-NCAM ist ein Neuroblastenmarker, dem eine wichtige Rolle in der Migration und dem Differenzierungsvorgang zugeschrieben wird (Kim et al. 2009). Somit scheint nahe zu liegen, dass TSA im Gegensatz zu VPA zu einer Entdifferenzierung führt, wobei die Differenzierungsreaktion auch zelltypspezifisch unterschiedlich zu sein scheint. In unseren Versuchen konnten wir ein einheitliches Verhalten der Neuroblastomzelllinien SKN-SH und SH-SY5Y auf die Behandlung mit VPA zeigen. Wurden diese Zellen jedoch mit TSA behandelt, verhielten sie sich bezüglich ihres Expressionsverhalten different. Zeigten die Neuroblastomzelllinien SKN-SH und SH-SY5Y nach der Inkubation mit VPA beide eine nur mäßige Hochregulation der NCAM-Expression, so konnte unter dem Differenzierungsagenz TSA bei der Zelllinie SKN-SH eine hohe Steigerung der NCAM-Expression festgestellt werden, wohingegen die Zelllinie SH-SY5Y kein verändertes Expressionsverhalten bezüglich der NCAM-Expression zeigte. Eine mögliche Erklärung für das unterschiedliche Differenzierungsverhalten könnte sein, dass die Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y deutlich höher differenziert ist (Sadec et al. 1987). Vorstellbar wäre, dass hier eine Dedifferenzierung, messbar durch die erhöhte NCAM-Expression, deutlich schwieriger zu induzieren ist. Dennoch weist die Zelllinie SH-SY5Y nach der Behandlung mit VPA zwar keinen ausgeprägten, aber durchaus einen mäßigen Expressionsanstieg von NCAM auf. Hierbei scheint somit nicht nur der vorbestehende Differenzierungsgrad der Zelllinie für das unterschiedliche Ansprechen auf die beiden HDAC-Inhibitoren verantwortlich zu sein. Wie bereits diskutiert (Kap. 5.1.2), könnte ebenso die unterschiedlich starke Inhibierungspotenz von TSA und VPA zu einer differenten HDAC-Rekrutierung geführt haben. VPA inhibiert bevorzugt die HDAC-Klasse I. TSA hingegen ist in der Lage, gleichermaßen die HDAC-Klassen I und II zu inhibieren (Gurvich et al. 2004). Somit kann anhand der differenten NCAM-Expression nach VPA- bzw. TSA-Behandlung ein

Rückschluss auf die HDAC-Funktion der Klasse I und II gezogen werden. Es wäre somit denkbar, dass die Dedifferenzierung, messbar durch die erhöhte NCAM-Expression, durch die HDAC-Klasse I reguliert wird.

Das unterschiedliche Verhalten der einzelnen Neuroblastomzelllinien konnte auch bezüglich der p-75-Expression nachgewiesen werden. Die Wirkung von TSA wurde, wie bereits oben dargelegt, von einigen Arbeitsgruppen als zellprotektiv und antiapoptotisch beschrieben, wobei die Arbeitsgruppe um Camelo mit einem Mausmodell arbeitete und Uo ausschließlich SH-SY5Y Zellen untersuchte (Camelo et al. 2005, Uo et al. 2009). Im Vergleich zwischen der p-75-Expressionsänderung unter dem Einfluss von VPA mit der p-75-Expressionsänderung durch den Einfluss des HDAC-Inhibitors TSA konnten wir ein differentes Expressionsverhalten feststellen. Als Neurotrophinrezeptor reguliert p-75 das Apoptoseverhalten neuronaler Zellen. Bei der Behandlung der Zellen mit VPA konnten wir in allen Neuroblastomzelllinien und in zwei der drei Bronchialkarzinomzelllinien eine Hochregulation der p75-Expression feststellen. Im Gegensatz hierzu zeigte die Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y auf die Inkubation mit TSA keine Veränderung ihres p-75-Expressionsverhaltens. Dieses Ergebnis korreliert mit den Ergebnissen von Uo et al. 2009, der ebenfalls beschrieb, dass keine Veränderung bezüglich der Apoptoserate bei Zelllinie SH-SY5Y festgestellt werden konnte. An diesen Ergebnissen zeigt sich deutlich, dass TSA und VPA trotz ihrer Gemeinsamkeit als HDAC-Inhibitor durch die differente Inhibierungspotenz der einzelnen HDACs sehr unterschiedlich in ihrer Wirkung sind. HDAC-Inhibitoren müssen somit nicht nur bezogen auf ihre Inhibierungspotenz der einzelnen HDACs, sondern auch jeweils bezogen auf die einzelnen Zelllinien charakterisiert werden.

5.3.2 Einfluss des Histondeacetylaseinhibitors Trichostatin A auf die Expression nicht-neuronaler Proteine

Viele andere Arbeitsgruppen beschäftigten sich bereits mit der HDAC-induzierten Expressionsveränderung neuronaler Zellen. In der Regel diente jedoch TSA als einer der bestcharakterisierten HDAC-Inhibitoren dazu, diese Expressionsveränderungen zu untersuchen. Unsere Versuche sollten zeigen, dass die Differenzierungsinduktion der neuroendokrin differenzierten Malignome unter dem Einfluss von TSA vergleichbare Ergebnisse liefert wie die bereits in anderen Arbeitsgruppen beschriebenen Veränderungen. Hiermit wird eine bessere Beurteilung der Expressionsänderung unter VPA erreicht, da diese unter identischen

Versuchsbedingungen entstanden sind. Dies dient zum Ausschluss, dass die differenten Ergebnisse unter VPA im Vergleich mit TSA nicht aufgrund unterschiedlicher Versuchsbedingungen zustande gekommen, sondern tatsächlich auf die spezifische Wirkung von VPA zurückzuführen sind. Wie bereits im Kapitel 5.2.2 beschrieben, konnten wir die deutliche Zunahme der MHC-II-Expression unter TSA reproduzieren, die bereits Magner et al. 2000 nachgewiesen hatte. Allerdings konnten wir zeigen, dass die MHC Klasse II-Expressionsänderung insbesondere bei der Neuroblastomzelllinie SKN-SH unter VPA-Behandlung etwa drei Mal höher ausfiel als unter TSA-Behandlung. Im Gegensatz dazu war die VPA-induzierte prozentuale MHC-II-Expressionsänderung bei der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y etwa 5,7 -fach niedriger als die prozentuale MHC-II-Expressionsänderung unter TSA.

Die Induktion der MHC Klasse I-Expression durch TSA wurde durch andere Arbeitsgruppen als deutlich geringer als die MHC Klasse II-Expressionsänderung beschrieben (Magner et al. 2000). Die im Rahmen dieser Studie durchgeführten Versuche zeigten sehr deutlich, dass TSA nur einen geringen Einfluss auf die MHC Klasse I-Expression hat. So war die Expressionsänderung unter TSA bei der Neuroblastomzelllinie SKN-SH von MHC-Klasse I etwa 3-fach niedriger als die der MHC-Klasse II und knapp sieben Mal geringer als die MHC Klasse I-Expressionsänderung, die durch die Inkubation mit VPA erreicht werden konnte. Bei der Neuroblastomzelllinie SH-SY5Y konnten wir nach der TSA-Behandlung keine Änderung der MHC Klasse I-Expression feststellen. Diese Ergebnisse unterstreichen noch einmal die Heterogenität der einzelnen HDAC-Inhibitoren.

5.4. Klinischer Nutzen der Histondeacetylaseinhibitoren

HDAC-Inhibitoren werden bereits seit vielen Jahren in der Therapie von malignen Erkrankungen eingesetzt. Als erster HDAC-Inhibitor wurde Butyrat entdeckt (Boffa et al. 1978). Allerdings ist Butyrat eine übelriechende Substanz, die einer hohen β -Oxidation unterliegt und kaum wirksame Plasmaspiegel erreicht. Somit ist Butyrat für den *in-vivo*-Einsatz in der Humanmedizin kein geeignetes Medikament. Auch andere HDAC-Inhibitoren wurden bereits in der Tumorthherapie eingesetzt. Die differenzierende und antitumorale Wirkung von Valproinsäure wurde bei Neuroblastomen bereits 1997 durch Cinatl et al. beschrieben. Hierzu wird unter der Leitung der Universitätsklinik Regensburg seit 2000 eine noch nicht abgeschlossene, multizentrische Studie durchgeführt, bei der VPA bei Kindern und Jugend-

lichen mit histologischem Glioblastom, anaplastischem Astrozytom oder Gliosarkom eingesetzt wird (HIT-GBM-C-Studie zur Behandlung von Kindern und Jugendlichen mit malignen Gliomen, Protokoll C Studie im Kindesalter). 2001 wurden mehrere Phase-I-Studien mit dem HDAC-Inhibitor Phenylbutyrat an Patienten mit soliden, bisher therapie-refraktären Tumoren durchgeführt. Bei den soliden Tumoren handelte es sich in der Mehrzahl um Prostatakarzinome. Eine komplette Remission wurde allerdings in keiner der Studien bei keinem Patienten erreicht (Carduccu et al. 2001, Gilbert et al. 2001). Die Methylierung der DNA sowie eine Histon-Deacetylierung kann eine Unterdrückung der Expression des Östrogenrezeptors in humanen Brustkrebszellen hervorrufen (Keen et al. 2003). Es wurde bereits nachgewiesen, dass eine Gabe von 5-Aza-2'-Deoxycytidin (AZA) und TSA eine Re-Expression des Östrogenrezeptors auf mRNA- und Proteinebene in diesen Zellen induzieren kann. Die Behandlung von drei Östrogenrezeptor-negativen Zelllinien mit dem HDAC-Inhibitor Scriptaid führt schon nach 48 h zu einer Wachstumshemmung sowie zu einer erhöhten H3-sowie H4-Acetylierung. Eine Inkubation mit Scriptaid und AZA war effektiver für die Induktion des Östrogenrezeptors als eine Monotherapie mit den jeweiligen Hemmstoffen. In einem Mausmodell wurde ein vermindertes Tumorstadium nach Gabe von Scriptaid oder TSA beobachtet (Keen et al. 2003). Bei der Promyelozytenleukämie führt die Translokation t(15,17) zur Expression des Fusionsproteins PML/RAR α . Dieses Fusionsprotein bindet an Retinolsäurerezeptoren (Retinoic acid receptor alpha, RAR α). Physiologisch bindet der RAR α -Rezeptor in Abwesenheit von Retinolsäure an die DNA und führt dort durch die Aktivierung von HDACs zu einer Deacetylierung von Histonen und damit zu einer Unterdrückung der Transkription. Diese Unterdrückung der Transkription kann durch die Bindung von Retinolsäure an den RAR α -Rezeptor aufgehoben werden. Kommt es nun zu der Bindung des onkogenen PML/RAR α -Fusionsproteins an den RAR α -Rezeptor, so kann auch durch den Liganden Retinolsäure die Differenzierungsblockade nicht mehr aufgehoben werden. Dies führt zu einer dauerhaft gestörten Zellausdifferenzierung und damit zum klinischen Bild der Promyelozytenleukämie. VPA ist in der Lage, durch seine Funktion als HDAC-Inhibitor die Differenzierungsblockade aufzuheben. Hierdurch konnte bei 50% der erkrankten Patienten ein anitproliferativer Effekt festgestellt werden (Kuendgen et al. 2007, Göttlicher et al. 2001).

In jüngster Zeit konnte gezeigt werden, dass nicht nur maligne Erkrankungen auf die Gabe von HDACs ansprechen, sondern auch neurodegenerative Erkrankungen wie die Chorea Huntington Krankheit (Gardian et al. 2005) und die Amyotrophe Lateralsklerose (Petri et al. 2006) durch die Gabe von HDAC-Inhibitoren im Tiermodell einen mildereren klinischen Verlauf aufweisen. Dies scheint durch ein Ineinandergreifen verschiedener Mechanismen zu

Stande zu kommen: Das tumorunterdrückende („tumor suppressor“) Protein p53 koordiniert innerhalb des Zellzyklus die Entwicklung und Apoptose durch transkriptionsabhängige und transkriptionsunabhängige Mechanismen (Vousden & Lane 2007). Da sich ein längeres Überleben von Neuronen sowohl nach Insulten als auch bei neurodegenerativen Erkrankungen durch die Hemmung der p53-Aktivität nachweisen ließ (Morrison et al. 2003), wurde vermutet, dass ein Zusammenhang zwischen den neuroprotektiven Effekten von HDAC-Inhibitoren und der p53-Aktivität besteht. Uo et al. konnten 2009 zeigen, dass die Hemmung der HDAC-Klassen I und II einen neuronalen Zelltod durch die selektive Unterdrückung der Translation der p53-Zielgene verhindern kann. Zusätzlich konnte gezeigt werden, dass HDAC-Inhibitoren auch bei der p53-unabhängigen neuronalen Apoptose, am ehesten über eine Blockade des BAX-Signalweges, einen Zelltod verhindern können. HDAC-Inhibitoren scheinen also eher zu einer Blockade von proapoptotischen Faktoren zu führen, und nicht zu einer Induktion von antiapoptotischen Genen (Uo et al. 2009). Allerdings wurde dieser antiapoptotische Effekt bisher nur in neuronalen Zellen beobachtet. In nicht-neuronalen Tumorzellen führt der Einsatz von HDAC-Inhibitoren regelhaft zur Einleitung der Apoptose (Bolden et al. 2006, Dokmanovic et al. 2007).

Weitere Studien sollten sich damit beschäftigen, wie die HDAC-Inhibitoren in ihrer Struktur modifiziert werden könnten, sodass isoliert spezifische Isoenzyme der HDAC gehemmt werden könnten. Und wie bereits mehrfach in den vorangegangenen Kapiteln betont, sollte eine weitere Charakterisierung der zellspezifischen Interaktion einzelner HDAC-Inhibitoren mit dem jeweiligen Zielgewebe vorgenommen werden, um eine valide Aussage über die medikamentösen Modifikationsmöglichkeiten der Transkriptionsprozesse zu erhalten.

6. Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1	Nukleosom: Die DNA-Doppelhelix windet sich um octamere Proteinkomplexe aus den Histonen H2A, H2B, H3 und H4. Das Histon H1 ist an ein Zwischenstück gebunden. Löffler & Petrides 5. Auflage, S.159	7
Abbildung 2	Schematische Darstellung des DNA-Histon-Komplexes im Chromatin Löffler & Petrides 5. Auflage, S.159	8
Abbildung 3	Regelkreis der Histonacetylierung und Histondeacetylierung, Rönndahl, 2005	9
Abbildung 4	Strukturformel von Valproinsäure, Rönndahl 2005	11
Abbildung 5	Strukturformel von Trichostatin A, Rönndahl 2005	12
Abbildung 6	Schematischer Schnitt durch die Darmwand des Dünndarms (modifiziert nach Gershon & Erde 1981)	22
Abbildung 7	präparierter Plexus myentericus mit netzartiger Struktur, Vergrößerung 1/100, Schäufele 2005	23
Abbildung 8	dissoziierter Plexus myentericus, Vergrößerung 1/250, Phasenkontrastmikroskopie, Schäufele 2005	24
Abbildung 9	Strahlengang des FACSCalibur, modifiziert, Quelle BD Biosciences (http://www.bdbiosciences.com/wcmimages/facscalibur_features_opticalpath.jpg)	26
Abbildung 10	Basale Expression von Neurofilament (70 kDa)	32
Abbildung 11	Basale Expression von NCAM	33
Abbildung 12	Basale Expression von HuD	34

Abbildung 13	Basale Expression von Synaptotagmin	35
Abbildung 14	Basale Expression von p75	36
Abbildung 15	Basale Expression von MHC Klasse I	37
Abbildung 16	Basale Expression von MHC Klasse II	38
Abbildung 17	Basale Expression von bcl-2	39
Abbildung 18	Prozentuale Veränderung der Neurofilament-Expression nach Valproinsäure-Stimulation	41
Abbildung 19	Prozentuale Veränderung der NCAM-Expression nach Valproinsäure-Stimulation	42
Abbildung 20	Prozentuale Veränderung der HuD-Expression nach Valproinsäure-Stimulation	43
Abbildung 21	Prozentuale Veränderung der Synaptotagmin-Expression nach Valproinsäure-Stimulation	44
Abbildung 22	Prozentuale Veränderung der p-75-Expression nach Valproinsäure-Stimulation	45
Abbildung 23	Prozentuale Veränderung der MHC Klasse I-Expression nach Valproinsäure-Stimulation	46
Abbildung 24	Durchflusszytometrische Analyse der basalen Expression von MHC Klasse I von HEK	47
Abbildung 25	Prozentuale Veränderung der MHC Klasse II-Expression nach Valproinsäure-Stimulation	48

Abbildung 26	Prozentuale Veränderung der bcl-2-Expression nach Valproinsäure-Stimulation	49
Abbildung 27	Vergleich der NCAM-Expression der Neuroblastomzelllinien SKN-SH und SH-SY5Y unter dem Einfluss der Differenzierungsagenzien Trichostatin A und Valproinsäure	51
Abbildung 28	Vergleich der p-75- Expression der Neuroblastomzelllinien SKN-SH und SH-SY5Y unter dem Einfluss der Differenzierungsagenzien Trichostatin A und Valproinsäure	52
Abbildung 29	Vergleich der MHC Klasse I-Expression der Neuroblastomzelllinien SKN-SH und SH-SY5Y unter dem Einfluss der Differenzierungsagenzien Trichostatin A und Valproinsäure	53
Abbildung 30	Vergleich der MHC Klasse II-Expression der Neuroblastomzelllinien SKN-SH und SH-SY5Y unter dem Einfluss der Differenzierungsagenzien Trichostatin A und Valproinsäure	54
Abbildung 31	Expressionsverhalten von Plexus myentericus Zellen (Plexus) unter dem Einfluss der Differenzierungsagenzien VPA und TSA bezüglich ihrer MHC Klasse I-Expression	55

7 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1	Einteilung der Histondeacetylasen in Klassen und Subklassen	10
Tabelle 2	Stadieneinteilung des Neuroblastoms nach INSS-Kriterien	13
Tabelle 3a	anatomische Tumorausbreitung nicht-kleinzelliger Bronchialkarzinome entsprechend der TNM-Klassifikation	15
Tabelle 3b	Stadieneinteilung des nicht kleinzelligen Bronchialkarzinoms nach der UICC 2003 basierend auf der TNM-Klassifikation	16
Tabelle 4	Einteilung des Bronchialkarzinoms nach der Veterans Administration Lung Cancer Study Group	17
Tabelle 5	Verwendete Antikörper und Verdünnungsprotokoll der extrazellulären Markierung	29
Tabelle 6	Verwendete Antikörper und Verdünnungsprotokoll der intrazellulären Markierung	30
Tabelle 7	Übersicht über die basale Expression sämtlicher Proteine und Zell- linien	40
Tabelle 8	Übersicht über die prozentuale Expressionsänderung unter VPA- Stimulation sämtlicher Proteine und Zelllinien	50

8. Abkürzungsverzeichnis

ACTH	Adrenocorticotropes Hormon
ADC	analogue to digital conversion
AML	akute myeloische Leukämie
ED	extensive disease
FACS	fluorescence activated cell sorting
FITC	Fluorescein-Isothiocyanat
FSC	Forwardscatter
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondeacetylase
HDAC-Inhibitor	Histondeacetylase-Inhibitor
INSS-Kriterien	International Neuroblastoma Staging System
kDa	kilo Dalton
LD	limited disease
LE	limbische Encephalitis
LEMS	Lambert Eaton Myasthenes Syndrom
LP	long pass
mfi	mittlere Fluoreszenzintensität
MHC	Major Histocompatibilitäts Komplex
NF	Neurofilamentprotein
NHL	Non Hodgkin Lymphom
PMT	Photomultiplertubes
PSA-NCAM	polysialic acid-neural cell adhesion molecule

SCLC	small cell lung cancer
SP	short pass
SSC	Sidescatter
UICC	Union international contre le cancer
VPA	Valproinsäure
TSA	Trichostatin A

9. Literaturverzeichnis

1. Beecken W-D, Engl T, Ogbomo H, Relja B et al. **Valproic acid modulates NCAM polysialylation and polysialtransferase mRNA expression in human tumor cells.** *Int Immunopharmacol* 2005; 5:757-769.
2. Boffa LC, Vidali G, Mann RS, Allfrey VG. **Suppression of histone deacetylation in vivo and in vitro by sodium butyrate.** *J Biol Chem.* 1978; 253(10):3364-6.
3. Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW. **Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors.** *Nat Rev Drug Discov.* 2006; 5(9):769-84.
4. Brodeur GM, Pritchard J, Berthold F, Carlsen NL et al. **Revisions of the international criteria for neuroblastoma diagnosis, staging and response to treatment.** *Prog Clin Biol Res.* 1994; 385:363-9.
5. Brownell JE & Allis CD. **Special HATs for special occasions: linking histone acetylation to chromatin assembly and gene activation.** *Curr Opin Genet Dev.* 1996; 6(2):176-84.
6. Camelo S, Iglesias AH, Hwang D et al. **Transcriptional therapy with the histone deacetylase inhibitor trichostatin A ameliorates experimental autoimmune encephalomyelitis.** *J Neuroimmunol.* 2005; 164: 10-21.
7. Carducci MA, Gilbert J, Bowling MK, Noe D, Eisenberger MA et al. **A Phase I clinical and pharmacological evaluation of sodium phenylbutyrate on an 120-h infusion schedule.** *Clin Cancer Res.* 2001; 7(10):3047-55.
8. Chen G, Yuan P-X, Jiang Y-M et al. **Valproate robustly enhances AP-1 mediated gene expression.** *Brain Res Mol Brain Res.* 1999; 64:52-58
9. Chen HL, Gabilovich D, Tampé R et al. **A functionally defective allele of TAP 1 results in loss of MHC class I antigen presentation in a human lung cancer.** *Nat Genet.* 1996; 13(2):139-40
10. Cheung WL, Briggs SD, Allis CD. **Acetylation and chromosomal functions.** *Curr Opin Cell Biol.* 2000; 12(3):326-33.

11. Chu PWK, Cheung WMW and Kwong YL. **Differential effects of 9-cis, 13-cis and all-trans retinoic acid on neuronal differentiation of human neuroblastoma cells.** Neuroreport. 2003; 14(15):1935-9
12. Cinatl J Jr, Cinatl J, Hernáiz-Driever P et al. **Sodium valproate inhibits in vivo growth of human neuroblastoma cells.** Anticancer Drugs. 1997; 8:958-963
13. Cinatl J Jr, Cinatl J, Scholz M et al. **Antitumor activity of sodium valproate in cultures of human neuroblastoma cells.** Anticancer Drugs. 1996; 7:766-773
14. Corriveau RA, Huh GS, Shatz CJ. **Regulation of class I MHC gene expression in the developing and mature CNS by neural activity.** Neuron. 1998; 21(3):505-520
15. Cremer H, Chazal G, Lledo PM, Rougon G, Montaron MF. **PSA-NCAM: an important regulator of hippocampal plasticity.** Int J Dev Neurosci. 2000; 18(2-3):213-20.
16. Cummings CJ, Sun Y, Opal P, Antalffy B, Mestril R et al. **Over-expression of inducible HSP 70 chaperone suppresses neuropathology and improves motor function in SCA1 mice.** Hum.Mol.Genet.2001; 10:1511-1518
17. Dalmau J, Graus F, Cheung NK, Rosenblum MK, Ho A, Cañete A, Delattre JY, Thompson SJ, Posner JB. **Major Histocompatibility Proteins, Anti-Hu Antibodies, and Paraneoplastic Encephalomyelitis in Neuroblastoma and Small Cell Lung Cancer.** Cancer. 1995; 75(1): 99-109
18. Darnell RB. **Immunologic Complexity in Neurons.** Neuron 1998; 21:947-050
19. Dole M, Nunez G, Merchant AK, Maybaum J, Rode CK, Bloch CA, Castle VP. **Bcl-2 Inhibits Chemotherapy-induced Apoptosis in Neuroblastoma.** Cancer Res. 1994; 54:3253-3259
20. Dokmanovic M, Clarke C, Marks PA. **Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives.** Mol Cancer Res. 2007; 5(10):981-9.
21. Edström E, Kullberg S, Ming Y, Zheng H, Ulfhake B. **MHC class I, beta2 microglobulin, and the INF-gamma receptor are up regulated in aged motoneurons.** Neurosci Res. 2004; 78:892-900

22. Encinas M, Iglesias M, Liu Y et al. **Sequential Treatment of SH-SY5Y Cells with Retinoic Acid and Brain-Derived Neurotrophic Factor-Dependent, Human Neuron-Like Cells.** J Neurochem. 2000; 75:991-1003
23. Forster JA, Quan N, Stern EL et al. **Induced neuronal expression of class I major histocompatibility complex mRNA in acute and chronic inflammation models.** J Neuroimmunol. 2002; 131:83-91
24. Fujii S, Huang S, Fong TC, Ando D, Burrows F, Jolly DJ, Nemunaitis J, Hoon DS. **Induction of melanoma-associated antigen systemic immunity upon intratumoral delivery of interferon-gamma retroviral vector in melanoma patients.** Cancer Gene Ther. 2000; 7:1220-30
25. Furness JB, Costa M, Rökaeus A, McDonald TJ, Brooks B. **Galanin-immunoreactive neurons in the guinea-pig small intestine: their projections and relationships to other enteric neurons.** Cell Tissue Res. 1987; 250:607-15
26. Gardian G, Browne SE, Choi DK, Klivenyi P, Gregorio JJ, Biol Chem et al. **Neuroprotective effects of phenylbutyrate in the N171-82Q transgenic mouse model of Huntington's disease.** J Biol Chem. 2005; 280(1):556-63
27. Gershon MD & Erde SM. **The nervous system of the gut.** Gastroenterology 1981; 80(6):1571-94
28. Glavan G, Schliebs R, Zivin M. **Synaptotagmins in Neurodegeneration.** Anat Rec 2009; 292:1849-1862
29. Göttlicher M, Minucci S, Zhu P, Krämer OH, Schimpf A, Giavara S, Sleeman JP, Lo Coco F, Nervi C, Pelicci PG, Heinzl T. **Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells.** EMBO J. 2001; 20:6969-6978
30. Gray SG and Ekström TJ. **The Human Histone Deacetylase Family.** Exp Cell Res. 2001; 262:75-83
31. Grunstein M. **Histone acetylation in chromatin structure and transcription.** Nature. 1997; 389(6649):349-52.

32. Gurvich N, Oxana M, Tsygankova OM, Meinkoth JL et al. **Histone Deacetylase is a Target of Valproic Acid-Mediated Cellular Differentiation.** *Cancer Res.* 2004; 64(3):1079-86
33. Haas D, Ablin AR, Miller C, Zoger S, Matthay KK. **Complete pathologic maturation and regression of stage IVS neuroblastoma without treatment.** *Cancer.* 1988; 62(4):818-825
34. Hassig CA, Symons KT, Guo X, et al. **KD5170, a novel mercaptoketone-based histone deacetylase inhibitor that exhibits broad spectrum antitumor activity in vitro and in vivo.** *Mol Cancer Ther* 2008; 7:1054-1065
35. Hero B, Graf N, Simon T, Weirich A, Tröger J. **Neuroblastoma preoperatively treated as nephroblastoma: does inadequate therapy worsen the prognosis?** *Klin Padiatr.* 2002; 214(4):157-61.
36. Hildebrand D, Tiefenbach J, Heinzl T, Grez M, Maurer AB et al. **Multiple regions of ETO cooperate in transcriptional repression.** *J Biol Chem.* 2001; 276(13):9889-95
37. Höglund P, Glas R, Ohlén C, Ljunggren HG, Kärre K et al. **Alteration of the natural killer repertoire in H-2 transgenic mice: specificity of rapid lymphoma cell clearance determined by the H-2 phenotype of the target.** *J Exp Med.* 1991; 174(2):327-34
38. Huh S, Boulanger LM, Du H, Riquelme PA, Brotz TM, Shatz CH. **Functional Requirement for Class I MHC in CNS Development and Plasticity Gene.** *Science.* 2000; 290(5499):2155-2159
39. Huynh KD, Bardwell VJ. **The BCL-6 POZ domain and other POZ domains interact with the co-repressors N-CoR and SMRT.** *Oncogene.* 1998; 17:2473-84
40. Jenuwein T & Allis CD. **Translating the histone code.** *Science.* 2001; 293(5532): 1074-80
41. Kanai H, Sawa A, Chen R-W, Leeds P, Chuang D-M. **Valproic acid inhibits Histone deacetylase activity and suppresses excitotoxicity-induced GAPDH nuclear accumulation anapoptotic death in neurons.** *The Pharmacogenomics J.* 2004; 4:336-344

42. Keen JC, Yan L, Mack KM, Pettit C, Smith D et al. **A novel histone deacetylase inhibitor, scriptaid, enhances expression of functional estrogen receptor alpha (ER) in ER negative human breast cancer cells in combination with 5-aza 2'-deoxycytidine.** Breast Cancer Res Treat. 2003; 81(3):177-86.
43. Kim HJ, Leeds P and Chuang D-M. **The HDAC inhibitor, sodium butyrate, stimulates neurogenesis in the ischemic brain.** J.Neurochem 2009; 110:1226-1240
44. Knüpfer MM, Hernáiz-Driever P, Poppenborg H et al. **Valproic Acid Inhibits Proliferation and Changes Expression of CD44 and CD56 of Malignant Glioma Cells in Vitro.** Anticancer Res. 1998; 18:3585-3590
45. Kuendgen A, Gattermann N. **Valproic Acid for the treatment of Myeloid Malignancies.** Cancer. 2007; 106:112-119
46. Löffler G & Petrides P. **Biochemie und Pathobiochemie.**1997; 5:159
47. Lu ZP, Ju ZL, Shi G-Y et al. **Histone deacetylase inhibitor Trichostatin A reduces anti-DNA autoantibody production and represses IgH gene transcription.** Biol Res; 2005; 330:204-209
48. Magner WJ, Kazim AL, Stewart C, Romano MA, Catalano G, Grande C, Keiser N, Santaniello F, Tomasi TB. **Activation of MHC Class I, II and CD 40 Gene Expression by Histone Deacetylase Inhibitors.** Journal of Immunology 2000; 165: 7017-7024
49. Miloso M, Villa D, Crimi M et al. **Retinoic Acid –Induced Neuritogenesis of Human Neuroblastoma SH-SY5Y Cells is ERK Independent and PKC Dependent.** J Neurosci Res. 2004; 75:241-252
50. Monneret C. **Histone deacetylase inhibitors.** Eur J Med Chem. 2005; 40:1-13
51. Mountain CF. **Revisions in the International System for Staging Lung Cancer.** Chest. 1997; 111(6):1710-7.
52. Morrison RS, Kinoshita Y, Johnson MD, Guo W, Garden GA. **p53-dependent cell death signaling in neurons.** Neurochem Res. 2003;1:15-27.
53. Neumann H, Cavalié A, Jenne DE, Wekerle H. **Induction of MHC Class I Genes in Neurons.** Science. 1995; 269(5223):549-52

54. Oehme I, Deubzer HE, Wegener D et al. **Histone Deacetylase 8 in Neuroblastoma Tumorigenesis**. Clin Cancer Res. 2009; 15: 91-99
55. O'Malley MB & MacLeish PR. **Induction of class I major histocompatibility complex antigens on adult primate retinal neurons**. J Neuroimmunol. 1993; 43:45-58
56. Pan T, Li X, Xie W, Jankovic J, Le W. **Valproic acid-mediated Hsp70 induction and anti-apoptotic neuroprotection in SH-SY5Y cells**. FEBS Lett. 2005; 579(30):6716-20
57. Petri S, Kiaei M, Kipiani K, Chen J, Calingasan NY et al. **Additive neuroprotective effects of a histone deacetylase inhibitor and a catalytic antioxidant in a transgenic mouse model of amyotrophic lateral sclerosis**. Neurobiol Dis. 2006; 22(1):40-9
58. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister e.V. (Hrsg) **Krebs in Deutschland 2005/2006. Häufigkeiten und Trends**. 7. Ausgabe. Berlin, 2010
59. Rocchi P, Ferreri AM, Magrini E, Perocco P. **Effect of butyrate analogues on proliferation and differentiation in human neuroblastoma cell lines**. Anticancer Res. 1998; 18:1099-103.
60. Rönndahl G. **Induktion von Tumorzellendifferenzierung durch Histondeacetylaseinhibitoren**. 2005: Dissertationsarbeit Universität Göttingen
61. de Ruijter AJM, van Gennip AH, Caron HN et al. **Histondeacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family**. Biochem J. 2003; 370:737-749
62. Sadee W, Yu VC, Richards ML, Preis PN, Schwab MR, Brodsky FM, Biedler JL. **Expression of neurotransmitter receptors and myc protooncogenes in subclones of a human neuroblastoma cell line**. Cancer Res 1987; 47:5207-12
63. Schäufele N. **Funktionelle Charakterisierung spannungsabhängiger Calciumkanäle am Plexus myentericus der Ratte**. Dissertationsarbeit 2004, Justus-Liebig Universität Giessen
64. Singh US, Pan J, Kao Y-L et al. **Tissue Transglutaminase Mediates Activation of RohA an MAP Differentiation of SH-SY5Y Cells**. J Biol Chem. 2003; 278(1):391-399.

65. Smirnov DA, Hou S, Ricciardi RP. **Association of Histone Deacetylase with Coup-TF in Tumororigenic Ad 12 Transformed Cells and Its Potential Role in Shut-Off of MHC Class I Transcription.** Virology. 2000; 268:319-328
66. Stockhausen M-T, Sjölund J, Manetopoulos C, Axelson H. **Effects of the histone deacetylaseinhibitor valproic acid an Notch signaling in human neuroblastoma cells.** Br J Cancer. 2005; 92:751-759
67. Takai N, Desmond JC, Kumagai T et al. **Histone Deacetylase Inhibitors Have a Pro-found Antigrowth Activity in Endometrial Cancer Cells.** Clin Cancer Res. 2004; 10:1141-1149
68. Taunton J, Hassig CA, Schreiber SL. **A mammalian histone deacetylase related to the yeast transcriptional regulator Rpd3p.** Science. 1996; 272(5260):408-11.
69. Turner BM. **Histone acetylation and an epigenetic code.** Bioassays. 2000; 22(9):836-45.
70. Uo T, Veenstra TD, Morrison RS. **Histone Deacetylase Inhibitors Prevent p53-Dependent and p53-Independent BAX-Mediated Neuronal Apoptosis through Two Dis-tinct Mechanisms.** J.Neurosci. 2009; 29(9):2824-2832
71. Voigt A and Zintl F. **Effects of Retinoic Acid and Proliferation, Apoptosis, Cyto-toxicity, Migration an Invasion of Neuroblastoma Cells.** Med. Pediatr Oncol. 2003; 40(4):205-213
72. Vousden KH, Lane DP. **p53 in health and disease.** Nat Rev Mol Cell Biol. 2007; 8(4):275-83
73. Watanabe Y. **TNM classification for lung cancer.** Ann Thorac Cardiovasc Surg. 2003; 9(6):343-50.
74. Yazawa T, Ito T, Kamma H, Suzuki T, Okudela K et al. **Complicated mechanisms of class II transactivator transcription deficiency in small cell lung cancer and neuroblastoma.** Am J Pathol. 2002; 161(1):291-300
75. Yamaji T, Kagaya A, Uchitomi Y et al. **Effects of Carbamazepine and Sodium Valproate on 5-HT-Induced Calcium Increase in Individual C6 Rat Glioma Cells.** Neuropsychobiology. 1996; 34:22-25

76. Yu E, Choi EK, Kim CJ. **Expression of promyelocytic leukemia protein increases during the differentiation of human neuroblastoma cells.** Virchows Arch. 2003; 442(3):278-83.
77. Yu Y-M, Han P-L, Lee J-K. **JNK pathway is required for retinoic acid-induced neurite outgrowth of human neuroblastoma SH-SY5Y.** Neuroreport.2003; 14(7):941-5
78. Zhang X-M, Li Q-M, Su D.-J, Wang N, Shan Z-Y, Jin L-H, Lei L. **RA induces the neural-like cells generated from epigenic modified NIH/3T3 cells.** Mol Biol Rep 2010; 37:1197-1202

10 Anhang

Erklärung

Ich erkläre: Ich hab die vorgelegte Dissertation selbständig, 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.

11. Publikationsverzeichnis

Kohr D, Tschernatsch M, Schitz K, Singh P, Kaps M, Schäfer KH, Diener M, Mathies J, Matz O, Kummer W, Maihöfner C, Fritz T, Birklein F, Blaes F. **Autoantibodies in complex regional pain syndrome bind to a differentiation-dependent surface autoantigen.** Pain 2009; 143(3):246-51

12. Danksagung

Im Entstehungszeitraum dieser Arbeit durfte ich von sehr vielen Menschen persönlich fachlich lernen. All diesen Menschen, die zum Gelingen dieser Doktorarbeit beigetragen haben, möchte ich herzlich danken.

Herrn Prof. Dr. med. Kaps möchte ich für die Möglichkeit danken, diese Arbeit an der Klinik für Neurologie der Justus-Liebig-Universität Giessen durchführen zu dürfen.

Insbesondere möchte ich mich bei Herrn Prof. Dr. med. Blaes für die Überlassung dieses vielfältigen und spannenden Themas und die geduldige Unterstützung bedanken. Ohne seine oft mitreißende Begeisterung, seine stets wohlwollende Betreuung, aber auch Dank seines Verständnisses für Familienplanung werde ich diese Zeit immer in bester Erinnerung haben.

Unmittelbar bei der Durchführung meiner Experimente habe ich von zahlreichen Menschen Unterstützung erfahren. Hierbei gilt mein herzlichster Dank Frau Dr. med. Marlene Tschernatsch, die mir in jeder schwierigen Situation zu helfen wusste und die mich geduldig in die Durchflusszytometrie und die Zellkultur einarbeitete.

Ganz herzlich möchte ich mich auch bei Herrn Prof. Dr. med. vet. Diener, Leiter des Veterinärphysiologischen Institutes der Justus-Liebig-Universität Gießen und seinem Team bedanken. In diesem sehr stimulierenden Umfeld durfte ich die Präparation und Primärkultur von Plexus myentericus-Zellen erlernen.

Sehr dankbar bin ich darüber hinaus meiner Familie und meinen Freunden für die vielen Ermutigungen und die tatkräftige Unterstützung an allen Fronten. Insbesondere meinem Mann Frank möchte ich an dieser Stelle danken. Bedanken möchte ich mich auch bei unserer Tagesmutter Frau Tatjana Horna, ohne deren liebevolle und zuverlässige Betreuung unserer Tochter mir das Weiterarbeiten an dieser Dissertation nur schwer möglich gewesen wäre.