

Aus der Klinik für Psychiatrie und Psychotherapie  
(Komm. Leiter: Prof. Dr. med. B. Bandelow)

im Zentrum Psychosoziale Medizin

der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

---

# **Untersuchung der Wirkung von HDAC- Inhibitoren auf das Amyloid-Vorläufer- Protein (APP) in Tumorzellen.**

INAUGURAL – DISSERTATION

zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät der  
Georg-August-Universität zu Göttingen

vorgelegt von  
Bennet Hensen

aus  
Berlin

Göttingen 2013

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. K. Kroemer

I. Berichterstatter: Prof. Dr. rer. nat. T. A. Bayer

II. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. G. Wulf

III. Berichterstatter/in: Prof. Dr. med. M. Oppermann

Tag der mündlichen Prüfung: 24. September 2013

# Inhaltsverzeichnis

---

<b>1</b>	<b>Einleitung .....</b>	<b>1</b>
<b>1.1</b>	<b>Das Amyloid-Vorläufer-Protein.....</b>	<b>1</b>
1.1.1	Bildung und Reifung des Amyloid-Vorläufer-Proteins.....	1
1.1.2	Die enzymatische Spaltung des Amyloid-Vorläufer-Proteins .....	2
1.1.2.1	Die amyloidogene Spaltung von APP .....	2
1.1.2.2	Die nicht-amyloidogene Spaltung von APP.....	3
1.1.3	Physiologie & Pathophysiologie von APP und seinen Spaltprodukten	4
1.1.3.1	Die wachstumsfördernde Wirkung von APP bzw. <i>sAPP<math>\alpha</math></i> .....	4
1.1.3.2	Die toxische Wirkung der A $\beta$ –Peptide .....	4
<b>1.2</b>	<b>Histon-Deacetylasen und deren Inhibitoren .....</b>	<b>5</b>
1.2.1	Desoxyribonukleinsäure (DNS), Chromatin und Histone.....	5
1.2.2	Die Modifikation der Histone durch Histon-Deacetylasen.....	5
1.2.2.1	Histon-Deacetylasen (HDAC) & Histon-Acetyltransferasen (HAT)..	6
1.2.2.2	HDAC-Klassen.....	6
1.2.2.3	HDAC und die Pathogenese maligner Erkrankungen.....	7
1.2.3	HDAC-Inhibitoren (HDACi) .....	7
1.2.3.1	Klassifikation der HDAC-Inhibitoren .....	8
1.2.3.2	HDAC-Inhibitoren, GRP78 und APP.....	8
1.2.3.3	In dieser Arbeit verwendete HDACi.....	9
1.2.3.3.1	Apicidin.....	9
1.2.3.3.2	Scriptaid .....	9
1.2.3.3.3	Sirtinol.....	10
1.2.3.3.4	APHA-Compound 8 .....	10
1.2.3.3.5	HDAC-Inhibition der verwendeten Medikamente.....	10
1.2.3.3.6	Verwendete Zellreihen Sw480 und BxPc3 .....	11
<b>1.3</b>	<b>Ziel der Arbeit.....</b>	<b>11</b>

<b>2</b>	<b>Material und Methoden .....</b>	<b>13</b>
<b>2.1</b>	<b>Material.....</b>	<b>13</b>
2.1.1	Antikörper .....	13
2.1.1.1	Primärantikörper.....	13
2.1.1.2	Sekundärantikörper .....	13
2.1.2	Medikamente.....	14
2.1.3	Materialien und Chemikalien.....	14
2.1.4	Geräte .....	18
2.1.5	Software.....	19
<b>2.2</b>	<b>Methoden.....</b>	<b>20</b>
2.2.1	Zellkultur.....	20
2.2.1.1	Subkultivierung und Passage der Zellen.....	20
2.2.2	Herstellung der Medikamentenstammlösungen .....	21
2.2.3	Proliferationsassay.....	21
2.2.3.1	Das Auszählen der Zellen.....	22
2.2.3.2	Hinzugabe der Medikamente .....	22
2.2.3.3	Hinzugabe der Reaktionslösung .....	23
2.2.3.4	Auswertung und statistische Analyse des Proliferationsassays .....	23
2.2.4	Immunfluoreszenz.....	23
2.2.4.1	Vorbereitung der <i>Chamberslide</i> .....	24
2.2.4.2	Hinzugabe der Medikamente .....	24
2.2.4.3	Hinzugabe des Primärantikörpers.....	25
2.2.4.4	Hinzugabe des Sekundärantikörpers .....	25
2.2.4.5	Entwicklung und Auswertung der Immunzytochemie .....	26
2.2.5	Medikamententestung mit der Sw480-Zellreihe .....	27
2.2.6	Zellyse.....	27
2.2.7	Colorimetrische Proteinkonzentrationsbestimmung.....	28
2.2.8	Western-Blot-Analyse (Immunblot) .....	29
2.2.8.1	Gelelektrophorese .....	29
2.2.8.2	Blotten.....	30
2.2.8.3	Hinzugabe des Primärantikörpers.....	30
2.2.8.4	Hinzugabe des Sekundärantikörpers .....	31

2.2.8.5	Entwicklung der Western-Blot-Analyse .....	31
2.2.8.6	Auswertung der Ergebnisse .....	32
2.2.8.6.1	Datenakquisition.....	32
2.2.8.6.2	Quantifizierung und statistische Auswertung.....	32
<b>3</b>	<b>Ergebnisse.....</b>	<b>34</b>
<b>3.1</b>	<b>Proliferationsassay .....</b>	<b>34</b>
3.1.1	Einfluss der Wirkung von DMSO auf die Proliferation .....	34
3.1.2	Ergebnisse der Zellreihe Sw480 .....	36
3.1.2.1	Apicidin .....	36
3.1.2.2	Scriptaid.....	37
3.1.2.3	Sirtinol .....	38
3.1.2.4	APHA-Compound 8.....	40
3.1.3	Ergebnisse der Zellreihe BxPc3.....	41
3.1.3.1	Apicidin .....	41
3.1.3.2	Scriptaid.....	42
3.1.3.3	Sirtinol .....	44
3.1.3.4	APHA-Compound 8.....	45
3.1.4	Vergleich der Wirkung von Apicidin und Scriptaid.....	47
<b>3.2</b>	<b>Immunfluoreszenz.....</b>	<b>48</b>
3.2.1	Ergebnisse der Zellreihe Sw480 unter Apicidineinfluss .....	48
<b>3.3</b>	<b>Western-Blot-Analyse.....</b>	<b>52</b>
3.3.1	Ergebnisse der Behandlung mit Apicidin oder Scriptaid.....	52
3.3.2	Ergebnisse der Behandlung mit Sirtinol oder APHA-Compound 8....	55
3.3.3	Quantitative Auswertung .....	56
3.3.3.1	Ergebnisse der Behandlung mit Apicidin.....	56
3.3.3.2	Ergebnisse der Behandlung mit Scriptaid .....	59
<b>4</b>	<b>Diskussion.....</b>	<b>62</b>
<b>4.1</b>	<b>Die HDAC-Inhibitoren inhibieren die Proliferation .....</b>	<b>65</b>

4.2	Apicidin senkt die APP-Konzentration.....	67
4.3	Der molekulare Mechanismus der Inhibierung.....	68
4.4	Die Alzheimer-Erkrankung und Krebs .....	73
4.5	Aussicht .....	74
5	Zusammenfassung .....	77
6	Anhang .....	79
6.1	Abbildungsverzeichnis.....	79
6.2	Tabellenverzeichnis .....	81
6.3	Abkürzungsverzeichnis .....	82
7	Literaturverzeichnis .....	84

# 1 Einleitung

---

## 1.1 Das Amyloid-Vorläufer-Protein

Das Amyloid-Vorläufer-Protein (*amyloid precursor protein*, APP), dessen Gen auf Chromosomen 21 liegt, ist ein integrales Membranprotein vom Typ I (*Singlepass-Transmembranprotein*) und wird in neuronalen und nicht neuronalen Geweben des Menschen exprimiert (Selkoe et al. 1988). Es gehört neben APLP1 und APLP2 zur Familie der Amyloid-Vorläufer-ähnlichen-Proteine (*amyloid precursor-like proteins*), welche untereinander große Homologien aufweisen (Wasco et al. 1992; Wasco et al. 1993). APP besitzt eine große N-terminale extrazelluläre Domäne, die in eine E1- sowie eine kohlenhydratreiche Domäne unterteilt wird. Die kohlenhydratreichen Domäne wird wiederum in die E2, auch die „zentrale APP-Domäne“ („*central APP domain*“, CAPPD) und die Linker-Region unterteilt. Beide werden durch eine unstrukturierte saure sowie flexible Domäne miteinander verbunden (Reinhard et al. 2005). Die Linker-Region – auch juxtamembrane Region genannt – enthält die Spaltungsstellen der  $\alpha$ - und  $\beta$ -Sekretase. Sie verbindet den extrazellulären Anteil von APP mit der spiralförmigen Transmembrandomäne, welche den Bereich enthält, in dem die  $\gamma$ -Sekretase zur Spaltung von APP ansetzt (Dahms et al. 2010). Weiterer Bestandteil des Amyloid-Vorläufer-Proteins stellt die im Zytoplasma gelegene intrazelluläre Domäne (*APP intracellular domain* = AICD) dar (Reinhard et al. 2005). Durch einen alternativen Spleißprozess und unterschiedliche posttranslationale Modifikationen entstehen aus dem 400 Kilobasen langen Amyloid-Vorläufer-Protein acht unterschiedliche Isoformen, die zwischen 110 und 135 kDa groß sind (Zheng und Koo 2006). APP695 ist die im zentralen Nervensystem am häufigsten exprimierte APP-Isoform. APP751 und APP770 werden dagegen besonders häufig in nicht neuronalen Zellen exprimiert (Selkoe 2001). APP750 und APP751 unterscheiden sich nur durch Exon 8 voneinander. APP770/751 und APP695 unterscheidet zusätzlich die Serinproteaseinhibitor-domäne des Kunitz-Typs, die zwischen der sauren und der E2-Domäne liegt (Sisodia et al. 1993). Diese Protease ist durch Exon 7 kodiert und kommt in den neuronalen APP695-Isotypen nicht vor (König et al. 1992).

### 1.1.1 Bildung und Reifung des Amyloid-Vorläufer-Proteins

APP wird per cotranslationalen Proteintransport im Endoplasmatischen Retikulum gebildet und anschließend N-glykosyliert. Diese Modifikation ist wichtig für die korrekte Faltung des Proteins (Dorner et al. 1987). Diese Form des Proteins wird als unreifes APP bezeichnet. Es

befindet sich hauptsächlich im Endoplasmatischen Retikulum und im cis-Golgi-Apparat. Das unreife APP wird anschließend im Golgi-Apparat O-glykolisiert, tyrosylsulfatiert und phosphoryliert (Weidemann et al. 1989). In dieser Form, die sich hauptsächlich im trans-Golgi-Apparat, in Vesikeln und in der Plasmamembran befindet, wird es als reifes APP bezeichnet (Tomita et al. 1998). Vom trans-Golgi-Apparat werden die APP-Moleküle in Vesikeln zur Plasmamembran transportiert, in der sich nur ein geringer Prozentsatz des in der Zelle produzierten APP befindet. Ein Hauptteil des gebildeten APP ist im Golgi- und im trans-Golgi-Apparat lokalisiert (Selkoe 1998). An der Plasmamembran wird APP durch das Internalisationsmotiv *YENPTY*, welches sich in der Nähe des intrazellulären C-Terminus von APP befindet (Chen et al. 1990; Lai et al. 1995), schon nach wenigen Minuten durch Clathrin-umhüllte Vesikel endozytiert (Koo und Squazzo 1994). Nach der Endozytose wird APP entweder dem Abbau zugeführt (Haass et al. 1992a) oder über das Rezeptor-Recycling zur Plasmamembran zurücktransportiert (Koo et al. 1996; Yamazaki et al. 1996).

### **1.1.2 Die enzymatische Spaltung des Amyloid-Vorläufer-Proteins**

Die Spaltung des Amyloid-Vorläufer-Proteins ist nach seinem bisher bedeutsamsten Spaltprodukt dem  $\beta$ -Amyloid benannt. Unterschieden wird dabei zwischen einer amyloidogenen und einer nicht-amyloidogenen Spaltung. Bei der amyloidogenen Spaltung wird das  $\beta$ -Amyloid, welches in der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung eine wichtige Rolle spielt, gebildet. Amyloidogen steht hier als Synonym für „ $\beta$ -Amyloid entstehend“. Die nicht-amyloidogene Spaltung von APP erzeugt, wie dem Namen zu entnehmen ist, keine Amyloid-bildenden A $\beta$ -Peptide. Diese Art der Spaltung überwiegt in allen nicht-neuronalen Zellen (Weidemann et al. 1989; Sisodia et al. 1990).

#### **1.1.2.1 Die amyloidogene Spaltung von APP**

Der Morbus Alzheimer ist eine neurodegenerative Erkrankung, welche für ca. 60 Prozent der weltweiten Demenzerkrankungen verantwortlich ist (Ferri et al. 2005). Die Erkrankung ist durch den Verlust von Synapsen und das Absterben von Neuronen im Zerebralkortex und Hippokampus charakterisiert. Im Gehirn von Alzheimer-Patienten finden sich an diesen Stellen histopathologisch sichtbare extrazelluläre Amyloid-Plaques, die aus fehlgefalteten A $\beta$ -Proteinen (Hashimoto et al. 2003) bestehen. Des Weiteren zeigen sich intrazelluläre neurofibrilläre Bündel, auch *Tangles* genannt, die aus hyperphosphoryliertem Tau zusammengesetzt sind (Selkoe 1991). Die Produktion und Aggregation der A $\beta$ -Monomere spielt gemäß der zu diesem Zeitpunkt anerkannten Hypothese eine wichtige Schlüsselrolle in der Pathogenese der Alzheimer-Krankheit.



Das 753 bis 770 Aminosäuren umfassende Amyloid-Vorläufer-Protein wird zunächst von der  $\beta$ -Sekretase und folgend von der  $\gamma$ -Sekretase in Amyloid- $\beta$ -Peptide gespalten (Sisodia 1992). Die extrazelluläre Spaltung des Amyloid-Vorläufer-Proteins durch die  $\beta$ -Sekretase, ein Transmembranprotein aus der Familie der Aspartat-Proteasen (Vassar et al. 1999), setzt ein lösliches extrazelluläres APPs $\beta$ -Fragment frei. Dieses besteht aus einem großen Anteil der APP-Ektodomäne (Seubert et al. 1993). Nach Spaltung verbleibt das membrangebundene C99-Fragment, auch  $\beta$ CTF genannt, welches am N-terminalen Anteil mit der ersten Aminosäure der A $\beta$ -Region beginnt sowie die komplette A $\beta$ -Proteinsequenz enthält (Selkoe 1999). Anschließend wird das C99-Fragment durch die  $\gamma$ -Sekretase im Bereich der Transmembranregion nicht sequenzspezifisch gespalten, wodurch das C-terminale Ende von A $\beta$  generiert und ins Lumen freigegeben wird (Haass et al. 1992b). Gleichzeitig wird das AICD-Fragment ins Zytosol der Zelle freigesetzt (Weidemann et al. 1989). Durch die nicht sequenzspezifische Spaltung entstehen A $\beta$ -Proteine, die sich C-terminal in ihrer Länge unterscheiden und zwischen 38 und 42 Aminosäuren lang sind (Selkoe und Wolfe 2007). A $\beta$ 40 stellt dabei die häufigste Isoform und A $\beta$ 42 mit fünf bis zehn Prozent der gesamten A $\beta$ -Produktion die zweithäufigste Isoform dar (Suzuki et al. 1994). Für die Entwicklung der Plaques haben sich die längeren Isoformen als relevanter erwiesen, da diese leichter aggregieren können (Jarrett et al. 1993).

### 1.1.2.2 Die nicht-amyloidogene Spaltung von APP

Die nicht-amyloidogene Spaltung ist insbesondere im Zusammenhang mit APP-positiven Tumoren in den Fokus der Forschung gerückt. In den Karzinomen entsteht durch eine übermäßige APP-Exprimierung eine erhöhte Spaltungsaktivität. Dies erhöht die Konzentration an wachstumsfördernden Produkten wie sAPP $\alpha$ .

APP wird zunächst durch die  $\alpha$ -Sekretase an Position 16 und 17 (Esch et al. 1990) innerhalb des extrazellulären Anteils der A $\beta$ -Domäne gespalten. Dabei wird das lösliche sAPP $\alpha$  generiert und in den Extrazellulärraum entlassen (Wang et al. 1991).

Die Spaltung von APP durch die  $\alpha$ -Sekretase wird dabei von vielen Faktoren beeinflusst. Zu diesen gehören Neurotransmitter, Wachstumsfaktoren und Zytokine (Mills und Reiner 1999). Nach Spaltung verbleibt ein 83 Aminosäuren langes Protein namens C83 oder  $\alpha$ CTF in der Membran. Dieses wird anschließend von der  $\gamma$ -Sekretase in ein AICD-Fragment und ein p3-Fragment getrennt. AICD wird dabei – analog zur amyloidogenen-Spaltung – ins Zytosol, p3 dagegen in den Extrazellulärraum entlassen (Sastre 2001; Haass et al. 1993c). Die Eigenschaft des p3-Fragments gibt dem „nicht-amyloidogenen Weg“ seinen Namen, denn es führt nicht

primär zu Amyloid-Plaques. Dennoch findet sich z. B. bei Menschen mit Trisomie-21 das p3-Fragment in präamyloiden Läsionen (Jang et al. 2010).

### **1.1.3 Physiologie & Pathophysiologie von APP und seinen Spaltprodukten**

Ogleich die primäre Rolle von APP bisher unbekannt ist, konnten dem Molekül verschiedenste physiologische Funktionen zugeordnet werden: APP und dessen Spaltprodukte, wie das sezernierte sAPP $\alpha$ , fördern die Bildung von Synapsen und deren Reparatur (Priller et al. 2006). Zudem erhöht es die neuronale Plastizität (Turner et al. 2003) und sorgt für den Eisenexport der Zelle (Duce et al. 2010). Diese Funktion wird durch Bereiche innerhalb der E1-Domäne möglich gemacht, welche Kupfer an der CuBD (*copper-binding domain*) (Small et al. 1994) und Zink zwischen Aminosäuresequenz 181 und 188 (Bush et al. 1993) zu binden vermögen. Auch Funktionen wie Migration, Adhäsion, Zell-Zell- und Zell-Matrix-Interaktionen werden durch Heparin-, Kollagen- und Laminin-bindende Domänen ermöglicht (Small et al. 1994; Multhaup et al. 1992).

#### **1.1.3.1 Die wachstumsfördernde Wirkung von APP bzw. sAPP $\alpha$**

Schon früh wiesen Experimente mit Fibroblasten, deren APP-Konzentration durch Antisinn-APP-Konstrukte (*antisense constructs*) gesenkt werden konnte, auf eine weitere Funktion des Proteins hin. Die Zellen wuchsen nach Senkung der APP-Konzentration langsamer. Das Wachstum konnten durch Zugabe von sAPP $\alpha$  wieder normalisiert werden (Saitoh 1989; Roch et al. 1993). Folglich wirkt APP als Wachstumsfaktor. Die aktive Domäne, die in den Experimenten den Proliferationsanstieg in den Fibroblasten auslöste, konnte mit der fünf Aminosäuren langen RERMS-Sequenz (APP328-332), die sich am N-terminalen Ende der extrazellulären E2-Domäne befindet, in Verbindung gebracht werden. (Ninomiya et al. 1993). Ergänzend konnte gezeigt werden, dass die N-terminale Heparin-Bindungsstelle der E1-Domäne, welche der RERMS-Sequenz vorgelagert ist, Ähnlichkeiten mit cysteinreichen Wachstumsfaktoren hat und das Wachstum von Neuriten der Nervenzellen ebenso anregen kann (Rossjohn et al. 1999). Zu beachten ist, dass sich diese wachstumsfördernden Domänen in dem Bereich des Amyloid-Vorläufer-Proteins befinden, welches nach sequenzieller proteolytischer Spaltung durch  $\alpha$ - und  $\gamma$ -Sekretase sAPP $\alpha$  genannt wird.

#### **1.1.3.2 Die toxische Wirkung der A $\beta$ -Peptide**

A $\beta$ , ein in monomerer Form lösliches und damit nicht plaquebildendes Peptid, wird im physiologischen Stoffwechsel regelhaft gebildet und hat unter anderem eine antimikrobielle Funktion (Soscia et al. 2010). Das Peptid verändert bei pathologisch hohen Konzentrationen

seine tertiäre Konformation in eine Beta-Faltblatt-reiche Struktur. Diese veränderten Peptide lagern sich extrazellulär zu amyloiden Plaques zusammen (Ohnishi und Takano 2004). Inwiefern die Amyloid- $\beta$ -Peptide die Erkrankung auslösen, ist noch nicht vollständig geklärt. Der ursprünglichen Hypothese nach sind die aggregierten Amyloid-Fibrillen die toxische Form des Proteins. Sie stören den Kalziumhaushalt der Zelle, wodurch in der betroffenen Zelle die Apoptose ausgelöst wird (Yankner et al. 1990). Eine Alternativtheorie geht von intrazellulär toxischen Oligomeren aus, die in Axonen und Dendriten zytotoxisch wirken (Kokubo et al. 2005; Barghorn et al. 2005). Des Weiteren konnte nachgewiesen werden, dass A $\beta$ 42-Oligomere die synaptische Transmission inhibieren (Moreno et al. 2009). Diese Ergebnisse zeigen, dass APP – unabhängig von der zugrunde liegenden Theorie der A $\beta$ -Zytotoxizität – ein wichtiger Bestandteil in der Entstehung der Erkrankung ist. Einen Weg zur Inhibierung der Reifung von APP zu finden, ist daher nicht nur ein wichtiges Ziel in der Entwicklung neuer Therapien von Krebserkrankungen, sondern könnte auch neue Strategien zur Behandlung der Alzheimer-Erkrankung aufdecken.

## **1.2 Histon-Deacetylasen und deren Inhibitoren**

### **1.2.1 Desoxyribonukleinsäure (DNS), Chromatin und Histone**

DNS enthält die genetische Information zum Bau der Proteine, welche für das Überleben eines jeden Organismus, seine Entwicklung und den Stoffwechsel der Zelle notwendig sind. Die DNS ist aus Desoxyribonukleotiden aufgebaut und in Form einer Doppelhelix organisiert. Um die enorme Menge an Information im Zellkern speichern zu können, liegt DNS in komprimierter Form, dem Chromatin, vor. Chromatin besteht aus Nukleosomen, die sich wiederum aus je zwei Kopien der Histone H2A, H2B, H3 und H4, 146 Basenpaaren der DNS (Kern-DNS) und Nicht-Histonproteinen zusammensetzen. Die Kern-DNS windet sich in einer linksgängigen Helix 1,75-mal um die Kernhistonproteine H2A, H2B, H3 und H4. Die Nukleosome untereinander sind wiederum über die sogenannte Linker-DNS (ca. 50 Basenpaare) verbunden (Kornberg und Lorch 1999). Histon H1 verleiht dem Chromatin seinen Halt, indem es zum einen das Nukleosom, zum anderen die Linker-DNS bindet und dabei stabilisiert (Jean 1999).

### **1.2.2 Die Modifikation der Histone durch Histon-Deacetylasen**

Histone sind basische Proteine, die als Bestandteil des Chromatins zum einen wichtig für die Verpackung der sauren DNS, zum anderen bedeutend für die epigenetische Regulierung sind. Histone werden durch posttranslationale Modifikationen gesteuert, die in der Gesamtheit als „*Histon-Code*“ (Jenuwein und Allis 2001) bekannt sind. Zu diesen gehört unter anderem das

Entfernen durch Histon-Deacetylasen oder das Hinzufügen über Histonacetylasen von Acetylgruppen der Aminosäure Lysin auf dem N-terminalen Histonende.

### 1.2.2.1 Histon-Deacetylasen (HDAC) & Histon-Acetyltransferasen (HAT)

Die Acetylierung und Deacetylierung spielen besonders bei der Transkriptionsregulation sowie der DNS-Replikation eine wesentliche Rolle (Cheung et al. 2000).

Die Acetylierung verändert den Kondensationsgrad des Chromatins zu Euchromatin. Histon-Acetyltransferasen übertragen Acetylgruppen von Acetyl-CoA auf Lysin. Damit wird die positive Ladung der Aminosäure neutralisiert. In der Folge wird die elektrostatische Wechselwirkung zwischen der sauren, negativ geladenen Phosphatstruktur der DNS und der Histone geschwächt (Hong et al. 1993). Es entsteht die aktive, aufgelockerte Form der DNS, die den Transkriptionsfaktoren den Zugang und folglich das Ablesen der Geninformation ermöglicht.

Die Deacetylierung von Lysin durch die Histon-Deacetylasen führt dagegen zum verdichteten Heterochromatin. Die Histone werden hypoacetyliert und die Aminosäure Lysin bekommt wieder eine positive Ladung. Dadurch wird die Affinität der Histone zum negativ geladenen Phosphatgerüst der DNS erhöht. Transkriptionsfaktoren haben nun zur DNS keinen Zugang mehr, das Ablesen der Geninformation ist damit nicht mehr möglich (Grunstein 1997).

### 1.2.2.2 HDAC-Klassen

Die 18 humanen Histon-Deacetylasen (HDAC) werden in vier Hauptgruppen unterteilt. Diese Einteilung basiert auf Sequenz- und Domänenverwandschaft zu deren Orthologen in Hefe (Gregoretto et al. 2004). Zur ersten Gruppe gehören die HDAC 1, 2, 3 und 8, die ortholog zum Rpd3-Protein der Hefen (*reduced potassium dependency 3*) sind. Die HDAC sind im Nukleus lokalisiert und stellen die häufigsten und am meisten verbreiteten Histon-Deacetylasen dar (Gray und Ekström 2001).

Klasse-II-HDACs sind mit 100 bis 130 kDa größer als HDACs der Klasse I, die zwischen 40 und 55 kDa groß sind (Kao et al. 2002). Klasse II entspricht der Hefen-HDAC *hda1* (*histone deacetylase 1*). Basierend auf der DNS-Sequenz und den Domänen wird in der Klasse II die Unterkategorie IIa und IIb unterschieden. Die Klasse IIa enthält die HDACs 4, 5, 7 und 9, die Klasse IIB, HDAC 6 und 10. Klasse-II-HDACs können zwischen Nukleus und Zytoplasma wandern (Verdin et al. 2003). HDAC-Klasse-III besteht aus 7 Sirtuinen (SIRT1-7), die ortholog zum *Sir2* (*silent information regulator 2*) der Hefen sind.

Die Klasse IV enthält HDAC 11 und hat keine Orthologen in Hefe. Die Einteilung beruht hierbei auf einer ähnlichen DNS-Sequenz zu Klasse-I- und Klasse-II-HDAC (Voelter-

Mahlknecht et al. 2005). Die HDAC der Gruppe I, II und IV – insgesamt 12 Enzyme – sind zinkabhängige HDACs. Gruppe I und II können dabei durch Trichostatin A (TSA) inhibiert werden (Finnin et al. 1999). Die Sirtuine der Gruppe III benötigen hingegen  $\text{NAD}^+$  zur Deacetylierung und haben zusätzlich eine ADP-Ribosyltransferaseaktivität. Die Gruppe III ist nicht durch TSA inhibierbar (Blander und Guarente 2004; Vanhaecke et al. 2004). Neben ihrer Aufgabe der Histonmodifikation regulieren HDACs viele weitere Proteine, darunter Transkriptionsfaktoren, Chaperone wie HSP90, den Östrogen- sowie den Androgenrezeptor (Kim und Bae 2011). Eine Deacetylierung der Proteine führt zu ihrem Abbau über das Ubiquitin-Proteasom-System (Ito et al. 2002; Jin et al. 2004). Erwähnt werden muss dies, da neuere Studien gezeigt haben, dass die Hauptsubstrate der HDAC nicht die Histone, sondern die erwähnten Nicht-Histon-Proteine sind (Gregoretta et al. 2004).

### **1.2.2.3 HDAC und die Pathogenese maligner Erkrankungen**

Veränderungen der Chromatinstruktur, ausgelöst durch HDAC, spielen eine bedeutende Rolle bei der Entstehung verschiedener Tumoren (Fenrick und Hiebert 1998; Archer und Hodin 1999). Ein bekanntes Beispiel ist das Retinoblastom, bei dem es durch Mutation des Retinoblastomgens zu einem Verlust der Funktion beider Allele des RB1-Gens kommt. Das Retinoblastomprotein ist Teil eines Komplexes, der die HDACs zum Chromatin führt. Die Histon-Deacetylasen vermindert durch Deacetylierung die Transkription von S-Phase-fördernden Faktoren, wodurch die DNS-Synthese unterbunden wird. Ohne die Funktion des Retinoblastomgens können die HDAC nicht mehr wirken – eine erhöhte Proliferation ist die Folge (Brehm et al. 1998). Zudem zeigen verschiedene Studien, dass die Expression von HDAC in diversen Karzinomen verändert ist: Zu diesen zählt das Kolonkarzinom, in dem die Expression von HDAC2 und HDAC3 erhöht ist (Wilson et al. 2006), oder das Magenkarzinom, in dem HDAC1 in erhöhter Expression vorliegt (Choi et al. 2001). Dagegen ist zum Beispiel im Falle des Lungenkarzinoms eine verringerte Expression von HDAC5 und HDAC10 mit einer schlechten Prognose verbunden (Osada et al. 2004).

### **1.2.3 HDAC-Inhibitoren (HDACi)**

Histon-Deacetylase-Inhibitoren sind Enzyminhibitoren, die die Funktion von Histon-Deacetylasen hemmen. Im Fachgebiet der Psychiatrie ist der HDACi Valproat seit Langem ein etablierter Wirkstoff zur Stimmungsstabilisierung und der Behandlung von Epilepsie. Während der Neunzigerjahre konnte ein neues Einsatzgebiet der Medikamente identifiziert werden. Durch Hemmung der HDAC kann Tumorwachstum vermindert und das Überleben der Tumorzellen verhindert werden.

### 1.2.3.1 Klassifikation der HDAC-Inhibitoren

Histon-Deacetylase-Inhibitoren werden in Inhibitoren der zinkabhängigen HDACs (Klasse I, II und IV) und in Inhibitoren der NAD<sup>+</sup>-abhängigen HDACs (Klasse III) eingeteilt. Die NAD<sup>+</sup>-abhängigen HDACs können durch Nicotinamid, welches in der C-Tasche der Sirtuine bindet, gehemmt werden (Avalos et al. 2005).

Die zinkabhängigen HDAC-Inhibitoren werden in vier Gruppen eingeteilt:

1. Hydroxamsäuren (z. B. Trichostatin A)
2. Zyklische Tetrapeptide und Depsipeptide (z. B. Romidepsin)
3. Benzamide (z. B. Entinostat)
4. Aliphatische Säuren (z. B. Valproat)

Die Wirkweise aller im Folgenden vorgestellten Medikamente ist über ihre Eigenschaft als starke Zink-Chelatoren zu erklären. So können diese Medikamente das aktive Zentrum der HDAC reversibel hemmen (Codd et al. 2009; Wu et al. 2011). Die erste Substanz, bei der ihre Eigenschaft zur HDAC-Inhibition entdeckt wurde, war Trichostatin A, dem ein anti-inflammatorischer Effekt zugesprochen wird (Adcock 2007). Die Hydroxamsäure Trichostatin A stellt einen Klasse-I- und Klasse-II-HDAC-Inhibitor dar. Strukturell gleicht es dem erst kürzlich für die Behandlung des kutanen T-Zell-Lymphoms zugelassenen Medikament Vorinostat (Kim und Bae 2011). Entinostat, ein Medikament gegen Non-Hodgkin-Lymphome sowie Brust- und Lungenkarzinome, befindet sich momentan in Phase II der klinischen Studien (Tan et al. 2010). Valproat befindet sich in Phase-III-Studien zur Behandlung von Zervix- und Ovarialkarzinomen (Candelaria et al. 2007).

### 1.2.3.2 HDAC-Inhibitoren, GRP78 und APP

Das 78 kDa große „*glucose-regulated protein*“ GRP78 – auch „*binding immunoglobulin protein*“ (BiP) oder HSPA5 (*heat shock protein 5*) genannt – ist ein Chaperon, das der Familie der 70 kDa großen Hitzeschockproteine (Hsp70) zugeordnet wird. Es besteht aus einer ATPase-Domäne, einer peptidbindenden Domäne und einer C-terminalen Domäne (King et al. 2001). GRP78 ist in das Falten von Proteinen am Endoplasmatischen Retikulum involviert und spielt eine wesentliche Rolle in der Pathogenese zahlreicher Erkrankungen wie z. B. Diabetes, Herzerkrankungen, neurodegenerativer Erkrankungen sowie Karzinomen (Weng et al. 2011). GRP78 bindet das noch nicht gefaltete Protein vermittelt durch die N-terminale ATPase (Gething 1999) und aktiviert die PERK, ATF-6 und IRE1-Proteinkaskade, welche zur Aktivierung der „*unfolded protein response*“ (UPR) führt (Liu und Kaufman 2003). Die UPR

ist eine Antwort auf die Ansammlung von ungefalteten oder fehlgefalteten Proteinen. Folglich ist es die physiologische Aufgabe von GRP78, die Zellfunktion wiederherzustellen oder bei anhaltenden Missständen in der Proteinproduktion, die Apoptose zu aktivieren (Bateman 2006).

Durch Bindung von intrazellulärem APP über GRP78 kann die Reifung des Amyloid-Vorläufer-Proteins inhibiert werden (Venkataramani et al. 2010). Der HDACi Valproat kann das Chaperon GRP78 (Baumeister et al. 2009; Shi et al. 2007) gezielt inhibieren, indem Histon H4 hyperacetyliert wird. Diese Hyperacetylierung von Histon H4 korreliert direkt mit einem Anstieg der GRP78-Konzentration (Shi et al. 2007), welches seinerseits an APP bindet. In der Folge sinkt die Konzentration von reifen APP. Damit einhergehend sinkt die Sekretion von A $\beta$ 40, A $\beta$ 42 (Yang et al. 1998; Kakimura et al. 2002) und sAPP $\alpha$ . Venkataramani et al. konnten zeigen, dass sAPP $\alpha$  als Wachstumsfaktor auf BxPc3 (Pankreaskarzinom) und Sw480 (Kolonkarzinom) wirkt. Daher zeigt sich bei einem erhöhten GRP78-Spiegel eine signifikante Proliferationsabnahme der beiden Zellreihen (Venkataramani et al. 2010).

### **1.2.3.3 In dieser Arbeit verwendete HDACi**

#### **1.2.3.3.1 Apicidin**

Apicidin ist ein zyklisches Tetrapeptid, welches vom Pilz *Fusarium semitectum* produziert wird. Die Eigenschaften des HDAC-Inhibitors sind variabel. Apicidin inhibiert Enzyme von Parasiten wie Sporentierchen. Zudem konnte nachgewiesen werden, dass das Medikament auf Zellen von Säugetieren antiproliferativ wirkt (Darkin-Rattray et al. 1996; Andrews et al. 2000). Apicidin weist darüber hinaus die Eigenschaft auf, die Expression von fetalem Hämoglobin zu steigern, um damit einen Beitrag zur Therapie der  $\beta$ -Thalassämie zu leisten (Witt et al. 2003).

#### **1.2.3.3.2 Scriptaid**

Scriptaid ist eine Hydroxamsäure, deren Eigenschaft zur HDAC-Inhibition im Jahr 2000 bei der Durchsicht einer Medikamentendatenbank identifiziert werden konnte (Su et al. 2000). Scriptaid ist an Zellwachstumsprozessen, der Regulierung von Apoptose und der Differenzierung von Zellen beteiligt. (Takai et al. 2006). Zudem vermag Scriptaid wie Apicidin die Induktion von fetalem Hämoglobin auszulösen (Johnson et al. 2005). Der HDAC-Inhibitor inhibiert die HDAC-Klasse I, IIa und IIb (Ono et al. 2010).

### 1.2.3.3.3 Sirtinol

Sirtinol stellt unter den in dieser Arbeit verwendeten HDAC-Inhibitoren eine Ausnahme dar. Der Wirkstoff inhibiert zwei HDACs der Klasse III, auch Sirtuine genannt. Daher ist er kein Bestandteil der zinkabhängigen HDAC, sondern gehört chemisch der Gruppe der Hexanamide an. Sirtinol inhibiert spezifisch SIRT1 und SIRT2 (Ota et al. 2005; Mai et al. 2005).

### 1.2.3.3.4 APHA-Compound 8

APHA-Compound 8 ist dem in klinischen Studien befindlichen Vorinostat, auch SAHA (*suberoylanilide hydroxamic acid*) genannt, strukturverwandt und wird daher ebenso zu den Hydroxamsäuren gezählt (Blackwell et al. 2008). APHA-Compound 8 gehört der Klasse der zinkabhängigen HDAC-Inhibitoren an.

### 1.2.3.3.5 HDAC-Inhibition der verwendeten Medikamente

In der folgenden Tabelle ist eine Übersicht über die von mir in den Versuchen verwendeten Histon-Deacetylasen gezeigt. Diese soll Aufschluss darüber geben, auf welche HDAC die Medikamente anderen Studien zufolge Einfluss nehmen. Um die Medikamente mit dem APP-Inhibitor Valproat vergleichen zu können, wurden Apicidin, Scriptaid, Sirtinol und APHA-Compound 8 diesem gegenübergestellt.

**Tabelle 1:** Übersicht über die HDAC-Inhibitionsaktivität der in dieser Arbeit verwendeten HDACi und Valproat – modifiziert nach Blackwell et al. (2008), aktualisiert nach Mai et al. (2003); Vrba et al. (2011); Ota et al. (2005); Mai et al. (2005); Ono et al. (2010)

	Apicidin	Scriptaid	Sirtinol	APHA 8	Valproat
<b><u>Klasse I</u></b>					
HDAC1	Inhibierung	Inhibierung		Inhibierung	Inhibierung
HDAC2	Inhibierung	Inhibierung		Inhibierung	Inhibierung
HDAC3	Inhibierung	Inhibierung		Inhibierung	Inhibierung
HDAC8	Inhibierung	Inhibierung		Inhibierung	Inhibierung
<b><u>Klasse IIa</u></b>					
HDAC4	Inhibierung	Inhibierung		Inhibierung	Inhibierung
HDAC5		Inhibierung			Inhibierung



HDAC7		Inhibierung		Inhibierung	Inhibierung
HDAC9		Inhibierung			Inhibierung
<b><u>Klasse IIb</u></b>					
HDAC6	Inhibierung	Inhibierung		Inhibierung	Inhibierung
HDAC10	Inhibierung	Inhibierung		Inhibierung	Inhibierung
<b><u>Klasse III</u></b>					
Sirtuine 1-7			Inhibierung von Sirt1/2		
<b><u>Klasse IV</u></b>					
HDAC11					

#### 1.2.3.3.6 Verwendete Zellreihen Sw480 und BxPc3

Die in dieser Arbeit verwendeten Zellreihen wurden von Vivek Venkataramani zur Verfügung gestellt. Die Zellreihen BxPc3 und Sw480 haben sich bereits in Vorversuchen mit dem HDAC-Inhibitor Valproat bewährt.

BxPc3 ist eine adhärente humane Pankreasadenokarzinom-Zelllinie einer zum Zeitpunkt der Entnahme 61-jährigen Patientin. Sw480 ist eine adhärente, dem Gastrointestinaltrakt eines zum Zeitpunkt der Entnahme 50 Jahre alten männlichen Kaukasiers entnommene Kolonkarzinom-Zelllinie vom Adenokarzinomtyp.

Beide Zelllinien weisen eine HDAC-Überexprimierung auf (Spurling et al. 2008; Batra et al. 2010; Thangaraju et al. 2009). Wie bereits beschrieben, konnte der HDACi Valproat in Studien die Proliferation der beiden Zelllinien einschränken.

### 1.3 Ziel der Arbeit

Das Ziel der vorliegenden Arbeit war, weitere potente Histon-Deacetylase-Inhibitoren zu identifizieren, die das Wachstum von Tumorzellen inhibieren können. In der vorliegenden Arbeit wurde dabei der Einfluss von vier Histon-Deacetylase-Inhibitoren (Apicidin, Scriptaid, Sirtinol und APHA-Compound 8) auf gastrointestinale Tumoren untersucht. Des Weiteren sollte die Wirkweise der Medikamente analysiert werden. In vorherigen Studien konnte

gezeigt werden, dass HDAC-Inhibitoren wie Valproat über eine Hemmung der APP-Reifung wirken. In dieser Arbeit sollte geprüft werden, ob die von mir getesteten Medikamente ebenfalls über eine Hemmung der APP-Reifung wirken und folglich antiproliferativ auf Tumorzellen wirken.

Um diese Fragen zu beantworten, stellte ich vier zu überprüfende Arbeitshypothesen auf. Tabelle 2 gibt einen Überblick über die Arbeitshypothesen und die verwendeten Methoden.

**Tabelle 2:** Übersicht zur Darstellung meiner Arbeitshypothesen und die daraus folgende Methodik

<b>Arbeitshypothese</b>	<b>Methode</b>
Das Zellwachstum der Tumorzellen wird inhibiert.	Proliferationsassay
Die APP-Konzentration sinkt nach Medikamentengabe (Apicidin).	Immunfluoreszenz
Die Medikamente Apicidin und Scriptaid hyperacetylieren Histon 4 und erhöhen die GRP78-Produktion.	Western-Blot-Analyse
Die Medikamente Apicidin und Scriptaid inhibieren die Reifung des Amyloid-Vorläufer-Proteins.	Western-Blot-Analyse

Zunächst sollte der Einfluss der Medikamente auf das Wachstum der Tumore in Proliferationsassay-Analysen untersucht werden. Im Anschluss sollte der Einfluss der Medikamente auf das wachstumsfördernde APP auf zellulärer Ebene gezeigt werden. Hierfür wurde eine immunhistochemische Analyse mit einem der wirkstärkeren Medikamente durchgeführt.

Der molekulare Mechanismus der HDAC-Inhibitoren wurde mithilfe der Methode der Western-Blot-Analyse untersucht. Hierbei sollte untersucht werden, ob Apicidin, Scriptaid, Sirtinol und APHA-Compound 8 das Amyloid-Vorläufer-Protein in der Reifung inhibieren können. Zudem sollte die Frage beantwortet werden, ob dieser Effekt über den gleichen Wirkmechanismus wie bei Valproat, sprich Hyperacetylierung des Histons 4 und eine folgende GRP78-Überexprimierung, realisiert wird. Im Anschluss wurde zudem der Effekt auf reifes und unreifes APP genauer quantifiziert.

## 2 Material und Methoden

### 2.1 Material

#### 2.1.1 Antikörper

##### 2.1.1.1 Primärantikörper

Primärantikörper (Konzentration)	Herkunft	Firma
W-02 (1:5000)	Maus (monoklonal)	The Genetics Company, Schlieren, Schweiz
22C11 (1:100)	Maus (monoklonal)	Millipore Corporation, Billerica, Massachusetts, USA; ehemals Chemicon
$\beta$ -Aktin (1:5000)	Hase (polyklonal)	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA
APLP2 (1:3000)	Hase (polyklonal)	Calbiochem, Merck-Chemicals, Darmstadt, Deutschland
GRP78 (1:1000)	Hase (monoklonal)	Cell Signaling Technology, Inc., Danvers, Massachusetts, USA
Anti-acetyl-Histon H4 (1:1000)	Hase (polyklonal)	Millipore Corporation, Billerica, Massachusetts, USA

##### 2.1.1.2 Sekundärantikörper

Sekundärantikörper (Konzentration)	Herkunft	Firma
Anti-Maus Alexa Fluor 488 (1:200)	Affe (monoklonal)	Invitrogen Ltd, Inchinnan, Großbritannien
Anti-Maus Immunglobuline (HRP) (1:4000)	Ziege (polyklonal)	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark

Anti-Hase Immunglobuline (HRP) (1:3000)	Schwein (polyklonal)	Dako Denmark A/S, Glostrup, Dänemark
---	----------------------	--------------------------------------

### 2.1.2 Medikamente

Wirkstoffname	Löslichkeit	Firma
APHA-Compound 8	> 10 mg/ml in DMSO	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA
Apicidin	1mg/ml in DMSO	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA
Scriptaid	1mg/ml in DMSO	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA
Sirtinol	DMSO	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA

Angaben zur Löslichkeit des Produkts wurden den „Produktdetails“ der Firma Sigma-Aldrich entnommen.

### 2.1.3 Materialien und Chemikalien

Name	Firma/Zusammensetzung des Produktes
4',6-Diamidino-2-phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI)	Carl Roth GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
96 Well Cell Culture Plate	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster, Österreich
Albumin Fraktion V	Carl Roth GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Amersham Hybond-ECL Membrane	GE Healthcare, Little Chalfont, Großbritannien
CEA RH Medical XRay Screen Film Blue Sensitive	Firma Ernst Christiansen GmbH, Planegg, Deutschland

Cell Scrapers (831830)	SARSTEDT AG & Co, Nümbrecht, Deutschland
CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay	Promega Corporation, Madison, Wisconsin, USA
DAPI (4',6-Diamidino-2-phenylindol-Dihydrochlorid) / PBS-Lösung	1,5mg DAPI 1l steril gefiltertes PBS
Deckglas 24 x 60 mm	Menzel-Gläser, Gerhard Menzel GmbH, Braunschweig, Deutschland
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Carl Roth GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
DPBS (Dulbeccos Phosphat-gepufferte Salzlösung) 100 ml P04-36100 ohne Kalzium und Magnesium	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
DPBS(Dulbeccos Phosphat-gepufferte Salzlösung)-Pulver	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
EDTA	Research Organics Inc., Cleveland, Ohio, USA
Entwicklerkassette 18 x 24 cm	Dr. Goos-Suprema GmbH, Heidelberg, Deutschland
Entwicklerlösung	8 ml Lösung A 800 Lösung B 2.4 µl H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>
Mettler-Toledo-Pipetten	Mettler-Toledo GmbH, Gießen, Deutschland
Reaktionsgefäß 1,5 ml	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Falconröhrchen	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster, Österreich
Fetales Kälberserum (Fetal-Calf-Serum)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Feuchtkammer	Melamin, Deutschland
Fluorescence Mounting Medium	Dako UK Ltd, Cambridgeshire, Großbritannien

Gel-Blotting-Papers	Schleicher & Schuell BioScience, Deutschland
Karzinomzelllinien BxPc-3 Sw480	Die Zelllinien waren ein Geschenk von Prof. M. Ghadimi – Allgemeinchirurgie der Georg-August-Universität Göttingen
LabTek II <i>Chamberslide</i> System 145	Thermo Electron LED GmbH, Langenselbold, Deutschland
L-Glutamin	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Lösung A	200 mL 0.1M Tris-HCl, 50mg Luminol
Lösung B	22 mg Para-Hydroxycoumarinsäure in 20 mL DMSO
Luminol	Carl Roth GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Lysispuffer	50 mM Tris-HCl pH 7,5 150 mM NaCl 1 % Nonidet p40 1 % Triton X-100 2 mM EDTA + Protease Inhibitor Complete Mini
Medium für die Karzinomzelllinien	RPMI 1640 10 % Fetales Kälberserum 1 % L-Glutamin 1 % Penicillin/Streptomycin
Methanol	AppliChem GmbH, Darmstadt, Deutschland
Milk Powder Blotting Grade	Carl Roth GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Natriumchlorid (NaCl)	Carl Roth GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Nonidet p40	Roche Applied Science, Basel, Schweiz

Parafilm M PM996	Pechiney Plastic Packaging, Chicago, Illinois, USA
Para-Hydroxycoumarinsäure	Carl Roth GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Pasteur-Kapillarpipetten	Wilhelm Ulbrich GdbR, Bamberg, Deutschland
Penicillin/Streptomycin	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Pipetten 0,5-1 µl; 10-100 µl; 100-1000 µl	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster, Österreich
Ponceau-S	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA
Protease Inhibitor Complete Mini	Roche Applied Science, Basel, Schweiz
Roentoroll 25	Tetenal AG & Co. KG, Norderstedt, Deutschland
Roti®-Quant universal	Carl Roth GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
RPMI 1640	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Spectra Multicolor Broad Range Protein Ladder	Fermentas International Inc., Burlington, Kanada
Superfix 25	Tetenal AG & Co. KG, Norderstedt, Deutschland
TBS-T (Tris-Buffered Saline und Tween 20): 10-fach konzentrierte trisgepufferte Salzlösung mit 0,5 % Tween 20, pH 8	0.1 M Tris 0.15 M NaCl 0.5 % Tween-20
Transferpuffer für ProGel/ProGel-P und VarioGel	Anamed-Elektrophorese GmbH, Groß-Bieberau, Deutschland
Tris	Carl Roth GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Tris-HCl SDS Ladepuffer	Anamed-Elektrophorese GmbH, Groß-Bieberau, Deutschland

Triton X-100	Merck KGaA, Darmstadt, Deutschland
Trypan Blue 0,4% Solution	Sigma-Aldrich Corporation, St. Louis, Missouri, USA
Trypsin/EDTA 0,25 %/0,02 % in PBS, ohne Kalzium und Magnesium	PAN-Biotech GmbH, Aidenbach, Deutschland
Tween-20	Carl Roth GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
VarioGel Polyacrylamid-Fertiggele 4-12 %; 10 Bahnen	Anamed-Elektrophorese GmbH, Groß-Bieberau, Deutschland
VarioGel Tricin SDS Laufpuffer	Anamed-Elektrophorese GmbH, Groß-Bieberau, Deutschland
Wasserstoffperoxid 30 %	Carl Roth GMBH + CO. KG, Karlsruhe, Deutschland
Zellkulturflaschen	Greiner Bio-One International AG, Kremsmünster, Österreich

#### 2.1.4 Geräte

Name	Firma
CKX41 Mikroskop	Olympus Corporation, Tokyo, Japan
Curix 60	Agfa-Gevaert Group, Mortsel, Belgium
Duomax 1030	Heidolph Instruments GmbH & Co. KG, Schwabach, Deutschland
Heraeus Incubator	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Heraeus Megafuge 1.0 R Benchtop Centrifuge	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Minizentrifuge	National Labnet



Neubauer-Zählkammer	Glaswarenfabrik Karl Hecht GmbH&Co KG, Sondheim, Deutschland
Olympus BX 51	Olympus Corporation, Tokyo, Japan
Olympus DP50 Camera	Olympus Corporation, Tokyo, Japan
Perfection 1650	SEIKO EPSON CORPORATION, Japan
pH-Meter, pH192	WTW Wissenschaftlich-Technische Werkstätten GmbH, Weilheim, Deutschland
Power Station 300	Labnet International Inc., Edison, New Jersey, USA
UNO-Thermoblock	Biometra biomedizinische Analytik GmbH, Göttingen, Deutschland
Varioklav H+P	Thermo Fisher Scientific Inc., Waltham, Massachusetts, USA
Schüttel- und Mischgerät Vortex Genie 2-Mixer	Bender und Hobein AG, Zürich, Schweiz
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik mbH, Burgwedel, Deutschland
XCell II Sponge pad for blotting	Invitrogen Ltd, Inchinnan, Großbritannien
XCell II™ Blot Module	Invitrogen Ltd, Inchinnan, Großbritannien
XCell SureLock Mini-Cell	Invitrogen Ltd, Inchinnan, Großbritannien
μQuant-Microplate-Spectrophotometer	BioTek Instruments, Inc., Winooski, Vermont, USA

### 2.1.5 Software

Name	Firma
Adobe Acrobat Reader 9	Adobe Systems Incorporated, San Jose, California, USA
Citavi	Swiss Academic Software, Schweiz

GraphPad Prism V 5	GraphPad Software, Inc., La Jolla, California, USA
Image J Software	National Institute of Health, Bethesda, Maryland, USA
Microsoft Office 2007	Microsoft Corporation, Redmond, Washington, USA
Mikrowin 2000, V 4.04	Mikrotek Laborsysteme, Overath, Deutschland
Viewfinder/Studio Lite version 1.0.134	Better Light, Inc., San Carlos, California, USA

## 2.2 Methoden

### 2.2.1 Zellkultur

Die Tumorzellen wurden in Zellkulturflaschen verschiedener Volumina (75cm<sup>2</sup> für normale Lagerung, 25cm<sup>2</sup> für Medikamententestung) in einem Inkubator bei 37°C und einer CO<sub>2</sub>-Sättigung von 5 Prozent kultiviert. Die Zellkulturflaschen enthielten bei einer Größe von 75cm<sup>2</sup> 10 ml Medium und bei einer Größe von 25 cm<sup>2</sup> 5 ml Medium. Das Medium setzte sich aus RPMI-Standardlösung, die jeweils mit 10 Prozent fetalem Kälberserum, 1 Prozent Penicillin/Streptomycin und 1 Prozent L-Glutamin versetzt wurde, zusammen. Das Medium wurde alle zwei Tage gewechselt.

#### 2.2.1.1 Subkultivierung und Passage der Zellen

Eine Subkultivierung der Zellen wurde bei einer Konfluenz von circa 80 Prozent durchgeführt. Hierfür wurden die Zellen unter einem Abzug mit 3 ml 4°C kaltem DPBS (ohne Kalzium und Magnesium) gewaschen. Anschließend wurde den Flaschen 3 ml 37°C warmes Trypsin/EDTA hinzugefügt. Die Flaschen wurden nun für 5 bis 10 Minuten in den Zellinkubator gestellt, bis sich die Zellen durch die Spaltung der extrazellulären Adhäsionsproteine aufgrund der endopeptidatischen Wirkung des Trypsins von dem Boden der Zellkulturflasche lösten. EDTA ist ein Komplexbildner, der zweiwertige Ionen wie Ca<sup>2+</sup> und Mg<sup>2+</sup> bindet. Durch die Verminderung dieser Ionen wurde die Funktion der Zellintegrine gestört und die Wirkung von Trypsin unterstützt (Fitzgerald und Phillips 1985).

Abschließend wurde 5 ml zusätzliches Medium hinzugegeben. Die Zellsuspension wurde mit einer 10-ml-Pipette in ein 15-ml-Falconröhrchen transferiert, welches anschließend bei 4°C für vier Minuten bei 1100 Umdrehungen pro Minute (ca. 217 g) zentrifugiert wurde.

Das Zellpellet wurde in 1 bis 2 ml Medium resuspendiert und in einer 1:5 Verdünnung in neue Zellkulturflaschen, welche mit frischem Medium gefüllt waren, gebracht.

### **2.2.2 Herstellung der Medikamentenstammlösungen**

Um die Medikamententestungen mit den Histon-Deacetylase-Inhibitoren durchzuführen, mussten die in Pulverform vorliegenden Stoffe in Lösung gebracht werden.

Es stand jeweils ein Milligramm des Medikamentes zur Verfügung. Die jeweilige Löslichkeit der Stoffe wurde aus den Informationsblättern der Firma Sigma-Aldrich entnommen (siehe Absatz 2.1.2 Medikamente; Seite 14). Um eine 1-mM-Stammlösung der Medikamente herzustellen, mussten 1 mg Apicidin in 1,603 ml, 1 mg Scriptaid in 1,603 ml, 1 mg Sirtinol in 2,353 ml und 1 mg APHA-Compound 8 in 3,517 mg DMSO gelöst werden.

Die fertigen Stammlösungen wurden zu je 200 µl aliquotiert. Die Aliquots wurden bei minus 20°C im Kühlschrank gelagert. APHA-Compound 8 wurde den Anweisungen der Firma Sigma-Aldrich nach bei 2 bis 8°C aufbewahrt.

### **2.2.3 Proliferationsassay**

Der durchgeführte Proliferationsassay der Firma Promega beruht auf einer colorimetrischen Methode zur Bestimmung der proliferierenden bzw. lebenden Zellen. Das in der „*CellTiter 96® AQueous One*“-Lösung enthalten MTS (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium) wird in Gegenwart von Phenazinmethosulfat (PMS) durch Reduktion zu Formazan umgewandelt. Dieser chemische Vorgang findet wahrscheinlich durch das von den metabolisch aktiven Zellen gebildete NADPH/NADH statt (Berridge und Tan 1993).

Ziel des Proliferationsassays war, die wachstumshemmende Wirkung der Histon-Deacetylase-Inhibitoren auf die Tumorzellen zu zeigen. Dafür wurde die Wirkung verschiedener Medikamentenkonzentrationen auf die Proliferation der Zellen verglichen. Für den Proliferationsassay mussten 5000 Zellen ausgezählt werden. Diese wurden mit jeweils 100 µl Medium pro *Well* in eine *96-well-plate* gegeben. Jeder Versuchsansatz, sowohl die Kontrolle als auch die jeweilige Konzentrationen des Medikaments, wurden, um etwaige Messfehler zu verringern, dreifach pipettiert. Nach 24 Stunden wurden die Medikamente hinzugegeben und wirkten weitere 24 Stunden auf die Zellen ein. Anschließend wurde den Instruktionen von Promega folgend die „*CellTiter 96® AQueous One*“-Lösung hinzugegeben. Nach einer weiteren Inkubationszeit von zwei Stunden wurde die Extinktion mit dem µQuant-Microplate-Spectrophotometer gemessen. Die gemessene Absorption

entsprach der Menge des gebildeten löslichen Formazanproduktes und war dadurch direkt proportional zur Anzahl lebender Zellen in der Kultur (Promega 2005).

### **2.2.3.1 Das Auszählen der Zellen**

Die ersten Schritte des Proliferationsassays gleichen denen der Zellsubkultivierung (siehe Absatz 2.2.1.1 Subkultivierung und Passage der Zellen; Seite 20).

Das Zellpellett wurde gleichmäßig resuspendiert. 50 µl Zellsuspensat und 50 µl Trypanblau wurden in ein 0,5 ml großes Eppendorfgefäß pipettiert und anschließend mit dem Schüttelgerät gemischt. Danach wurde die auszuzählende Zellsuspension bei aufgelegtem Deckglas seitlich aufpipettiert. Die Suspension saugte sich durch Kapillarkraft in den Raum zwischen Zählkammer und Deckglas, dessen Dicke genau 0,1 mm beträgt.

Durch die Anfärbung der Zellen mit Trypanblau konnten lebende von toten Zellen unterschieden werden, da tote Zellen eine veränderte Membrandurchlässigkeit aufweisen und dadurch im Gegensatz zu den lebenden blau angefärbt werden. Jede der vier Kammern wurde unter dem Lichtmikroskop mäanderförmig ausgezählt.

Anschließend wurde aus den vier ausgezählten Werten der Mittelwert gebildet. Durch die 1:1-Verdünnung der Zellen mit Trypanblau wurde die ausgezählte Zellzahl mal 2 genommen. Zudem musste der errechnete Wert mit dem sich aus den Abmaßen der Neubauer-Zählkammer ergebenden Faktor von  $10^4$  multipliziert werden.

Der erhaltene Wert gab an, wie viele Zellen sich in 1 ml Zellsuspension befanden. Um die Menge in µl zu bestimmen, die benötigt wurde, um 5000 Zellen aus dem Zellsuspensat zu pipettieren, wurde zunächst die Zellzahl pro µl berechnet: Der Wert pro ml wurde durch 1000 geteilt.

Die gewünschte Zellzahl (5000) musste anschließend durch den neu errechneten Zellwert pro µl geteilt werden, um die zu pipettierende Menge in µl zu errechnen. Diese wurde nun aus der Zellsuspension zusammen mit RPMI-Medium in die *96-well-plate* pipettiert.

Die Menge Medium orientierte sich an der errechneten Menge Zellsuspensat, da jeweils 100 µl pro *Well* vorliegen sollten. Für jedes Medikament wurden jeweils drei *Wells* für die Kontrollen und drei *Wells* für jede Medikamentenkonzentration befüllt. Anschließend wurde die *96-well-plate* für 24 Stunden im Inkubator bei 37°C und 5 Prozent CO<sub>2</sub>-Sättigung inkubiert.

### **2.2.3.2 Hinzugabe der Medikamente**

Im nächsten Schritt erfolgte die Zugabe der Medikamente. Um jeweils ein gleiches Volumen von 105 µl pro *Well* zu gewährleisten, wurden gleichmäßig 5 µl zu den Zellen pipettiert. Da

5 µl Medikamentenlösung zu den 100 µl hinzugegeben werden sollten, musste die Konzentration des Medikaments in den 5 µl so hoch sein, dass in 105 µl die erwünschte Medikamentenkonzentration entstand. Hierfür wurde zunächst berechnet, wie hoch die Menge an Medikament in den 5 µl sein musste. Anschließend wurden aus den 1 mM Medikamentenstammlösungen Verdünnungen hergestellt, welche diese Konzentrationen enthielten. Das Volumen dieser Verdünnungen betrug 50 µl, im Falle von Apicidin jedoch 100 µl. Nach Erstellen der Verdünnungen wurden 5 µl der jeweiligen Konzentration in die *Wells* gegeben. Die *96-well-plates* wurden für weitere 24 Stunden bei 37°C und 5 Prozent CO<sub>2</sub>-Sättigung im Inkubator gelagert.

### **2.2.3.3 Hinzugabe der Reaktionslösung**

Nach der Einwirkzeit der Medikamente auf die Zellen konnte die „*CellTiter 96® AQueous One*“-Lösung zu den Zellen gegeben werden. 20 µl der Lösung wurde in jede *Well* pipettiert. Die *96-well-plate* wurde anschließend für zwei Stunden bei 37°C und 5 Prozent CO<sub>2</sub>-Sättigung inkubiert. Nach Ablauf der Zeit konnte die Absorption der *Wells* mit dem µQuant Microplate Spectrophotometer und einer Wellenlänge von 490 nm (Referenzfilter: 650 nm) gemessen werden. Diese Wellenlänge entspricht dem Absorptionsmaximum von Formazan dem Endprodukt der Umwandlung.

### **2.2.3.4 Auswertung und statistische Analyse des Proliferationsassays**

Die erhaltenen Werte wurden in das Statistik- und Auswertungsprogramm GraphPad Prism übertragen. Die Ausgabe der Daten erfolgte als Balkendiagramm. Jeder Balken stellt dabei das arithmetische Mittel der drei Werte einer Konzentration unter Angabe des Standardfehlers dar. Unterschiede zwischen den verschiedenen Medikamentenkonzentrationen wurden mit einer einfachen Varianzanalyse (ANOVA), gefolgt von einem Bonferroni-Post-Hoc-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 Prozent errechnet. Die Signifikanzen sind als Sternchen repräsentiert, wobei ein Sternchen (\*)  $p < 0.05$  entspricht, zwei Sternchen (\*\*)  $p < 0.01$  und drei Sternchen (\*\*\*)  $p < 0.001$  entsprechen.

## **2.2.4 Immunfluoreszenz**

Die Immunfluoreszenz ist eine Methode zum qualitativen Nachweis bestimmter Proteine. Zum einen kann die Morphologie der Zelle unter Medikamenteneinwirkung gezeigt werden, zum anderen kann der Nachweis einer quantitativen Abnahme des Zielproteins erbracht werden. Die Prinzipien der Immunfluoreszenz ähneln denen der Western-Blot-Analysen, da es auch hier zu einer Antigen-Antikörper-Reaktion kommt (indirekte Immunfluoreszenz).

Für die durchgeführten Versuche wurden die Zellen in einem *Chamberslide* herangezüchtet. Dies hatte den Vorteil, dass die Zellen direkt auf dem Glasobjektträger wuchsen. Nach Erreichen der gewünschten Konfluenz wurden die Zellen zunächst fixiert. Anschließend wurde ein Primärantikörper, der an das gewünschte Zielprotein bindet, hinzugegeben. Im Sekundärantikörper unterscheiden sich die Immunfluoreszenz und die Western-Blot-Analyse. Für die Immunfluoreszenz tragen die Antikörper kein Enzym, welches die Chemilumineszenz von Luminol katalysiert, sondern sind mit Fluorochromen (Alexa Fluor® 488) verbunden. Diese werden mithilfe eines Epifluoreszenz-Mikroskops (Olympus BX) sichtbar gemacht. Der Laser des Mikroskops erzeugt ein Licht einer bestimmter Wellenlänge, woraufhin ein bestimmtes Fluorochrom angeregt wird (Beispiel: 495 nm Wellenlänge beim DNS-spezifischen Kernfärbestoff DAPI; siehe Absatz 2.2.4.4 Hinzugabe des Sekundärantikörpers; Seite 25). Diese emittieren wiederum Licht einer anderen Wellenlänge. Im Mikroskop trennen Filter und Farbteiler das emittierte und das vom Laser kommende Licht auf. Nur das Fluoreszenzlicht, welches vom Antikörper ausgeht und in der Regel längerwellig ist, wird an das Okular weitergegeben und kann von der Kamera des Mikroskops aufgenommen werden (Ghiran 2011).

#### **2.2.4.1 Vorbereitung der *Chamberslide***

Die Vorbereitung der Zellen zur Immunfluoreszenz gleicht dem der Subkultivierung der Zellen (siehe Absatz 2.2.1.1 Subkultivierung und Passage der Zellen; Seite 20). Zuerst wurde eine bestimmte Anzahl Zellen in die *Chamberslide* pipettiert. Dafür wurde zuerst in alle vier Kammern 1 ml RPMI-Medium pipettiert. Anschließend wurden pro Fach ca. 5 bis 10 µl Zellsuspensat hinzupipettiert. Die *Chamberslide* wurde inkubiert. Dabei wurde täglich das Anwachsen der Zellen kontrolliert und ein Mediumwechsel durchgeführt. Nach gutem Anwachsen der Zellen an die Glasobjektträger konnte mit der Medikamententestung begonnen werden.

#### **2.2.4.2 Hinzugabe der Medikamente**

Um die benötigte Konzentration von 5 µM Apicidin zu erreichen, wurden 6 µl der 1-mM-Apicidinstammlösung in 1,2 ml RPMI-Medium gelöst. Um eine 10-µM-Apicidinlösung herzustellen, wurden 12 µl der Stammlösung in 1,2 ml RPMI-Medium gelöst. Für die Medikamententestung wurden die Zellen zunächst mit 37°C warmen, sterilen DPBS gewaschen. Aus der Medikamentenstammlösung mit der gewünschten Apicidinkonzentration wurde 1 ml Medium entnommen und in das entsprechend beschriftete Fach der *Chamberslide*

pipettiert. Diese wurde anschließend bei 37°C und bei 5 Prozent CO<sub>2</sub>-Sättigung für 24 Stunden gelagert, sodass die Medikamente einwirken konnten.

#### **2.2.4.3 Hinzugabe des Primärantikörpers**

Um die Zellen in ihrem Zustand zu erhalten, mussten diese fixiert werden. Die Fixation wurde mit minus 20°C kaltem Methanol durchgeführt. Dieses führt als organisches Lösungsmittel zur Präzipitation und Denaturierung der Zellproteine. Dadurch wird die Zelle stabilisiert und gleichzeitig abgetötet und kann sich während der Färbeprozesse weniger verändern.

Für die Fixierung wurde zunächst das Gemisch aus Medium und den Medikamenten aus der *Chamberslide* abgesaugt. Gleichzeitig wurde 37°C warmes DPBS hinzugefügt. Dieser Vorgang wurde ein- bis zweimal zum Waschen wiederholt. Nun wurden die Zellen in jedem Fach der *Chamberslide* für 6 Minuten mit 1 ml minus 20°C kaltem Methanols fixiert und in einem Kühlschrank bei minus 20°C gelagert. Nach der Fixierung wurden die Zellen dreimal mit 500 µl unsterilem PBS gewaschen. Anschließend folgte die Permeabilisation der Zellen mit 200 µl PBS, gemischt mit 0,5 Prozent Triton X-100 (Octoxinol 9), wobei das Octoxinol 9 die Zellmembran für intrazelluläre Zielantigene durchlässig macht (Helenius und Simons 1975). Die Zellen wurden anschließend für 5 bis 10 Minuten in einer Feuchtkammer gelagert. Danach wurde die PBS-Lösung abgesaugt. Abschließend wurden die Zellen für 30 Minuten bei Raumtemperatur blockiert, um das nicht-spezifische Binden der Antikörper zu verhindern. Dafür wurde jeweils 2 ml der Blockierlösung (PBS plus 10 Prozent FCS plus 4 Prozent Milchpulver) zu den Fächern gegeben. Dabei wurden die Bindungsstellen von den reaktionslosen Proteinen des Milchpulvers gebunden und folglich die Antikörperbindung verhindert. Während des Blockierens wurde der Primärantikörper für APP (22C11) in der Verdünnung 1:100 vorbereitet. Es wurden 200 µl Antikörper in jedes Fach der *Chamberslide* pipettiert. Die *Chamberslide* wurde anschließend über Nacht in der Feuchtkammer bei 4°C inkubiert.

#### **2.2.4.4 Hinzugabe des Sekundärantikörpers**

Nach einer Inkubationszeit von 24 Stunden wurden die Zellen dreimal mit je 500µl unsterilem DPBS gewaschen. Anschließend wurde unter Lichtschutz 200 µl des Sekundärantikörpers Alexa Fluor 488 (Grün) in einer Konzentration von 1:200 hinzugegeben. Die Zellen wurden anschließend für zwei Stunden bei Raumtemperatur in einer Dunkelkammer inkubiert. Nach der Inkubation wurden die Zellen dreimal mit je 500 µl unsterilem DPBS gewaschen. Nun wurde der Kammerteil der *Chamberslide* mit dem dafür vorgesehenen Instrument der Firma LabTek entfernt. Die fixierten Zellen auf dem Glasträger wurden für 45 Sekunden in einer

1,5 mg/l DAPI-Lösung inkubiert. 4',6-Diamidino-2-phenylindol-Dihydrochlorid ist ein Fluoreszenzfarbstoff, der die Adenosin-/Thymidin-reichen Regionen in den kleinen Furchen der DNS bindet und dort unter ultraviolettem Licht besonders stark in einem blauen Licht fluoresziert (Tanious et al. 1992). DAPI bindet auch an RNA, wobei hier aber die Fluoreszenz weitaus schwächer als bei der Bindung an Adenosin-/Thymidin-reiche DNS-Regionen ist. Aus diesem Grund wird DAPI als DNS-spezifisch bezeichnet (Krishan 2005).

Anschließend wurden vier Tropfen „*Fluorescence-Mounting-Medium*“ auf den Objektträger pipettiert und mit einer Deckplatte bedeckt. Die entstandenen Luftblasen wurden vorsichtig vom Objektträger gedrückt. Zur Lagerung wurde der Objektträger an einem lichtgeschützten Ort bei Raumtemperatur deponiert.

#### 2.2.4.5 Entwicklung und Auswertung der Immunzytochemie

Um das Präparat auszuwerten, wurde das Olympus-BX-51-Mikroskop verwendet. Die Wellenlänge zur Anregung des jeweiligen Fluorochroms (Alexa Fluor 488: 495nm; 4',6-Diamidino-2-phenylindol-Dihydrochlorid: 358nm) wurde am Mikroskop eingestellt. Die Bilder wurden bei gleichbleibenden Einstellungen und Belichtung ohne Schwarzabgleich und ohne UV-Filter mit der Olympus-DP50-Kamera und dem Programm „*ViewFinder/Studio*“ aufgenommen, damit die Bilder untereinander vergleichbar waren. Die Einstellungen können der folgenden Tabelle entnommen werden.

**Tabelle 3:** Einstellungen „*Viewfinder/Studio*“ für die Aufnahme der Immunfluoreszenz von Sw480-Zellen unter dem Einfluss von Apicidin

	Belichtungsdauer	Sensitivität	Belichtungsangleichung
Anti-Maus Alexa Fluor 488	1/8 Sekunden	100	0
4',6-Diamidino-2-phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI)	1/90	100	0



Die Aufnahmen der BxPc3-Zellen wurden mit Schwarzabgleich unter folgenden Bedingungen ausgeführt.

**Tabelle 4:** Einstellungen „Viewfinder/Studio“ für die Aufnahme der Immunfluoreszenz von BxPc3-Zellen

	Belichtungsdauer	Sensitivität	Belichtungsangleichung
Anti-Maus Alexa Fluor 488	1/6 Sekunden	100	0
4',6-Diamidino-2-phenylindol-Dihydrochlorid (DAPI)	1/100	100	0

### 2.2.5 Medikamententestung mit der Sw480-Zellreihe

Für die Pharmatestung wurden die Tumorzellen nach der Subkultivierung mit 5 ml RPMI-Medium in eine 25-cm<sup>2</sup>-Zellkulturflasche gebracht. Die Zellen wuchsen auf eine Konfluenz von ca. 80 bis 90 Prozent an.

Nach Erreichen dieser Konfluenz wurden die Zellen mit 4°C kaltem DPBS gewaschen. Anschließend wurden die Tumorzellen mit 2 ml eines Gemisches aus RPMI-Medium und Medikamenten behandelt. Dieses wurde vorher in jeweils einem Falconröhrchen vorbereitet. Die 96-Well-plate wurde nach Zugabe der HDAC-Inhibitoren im Inkubator bei 37°C und 5 Prozent CO<sub>2</sub>-Sättigung für 24 Stunden gelagert, sodass die Medikamente auf die Zellen einwirken konnten. Anschließend wurden die Zellen lysiert. Als Kontrolle dienten nicht behandelte Tumorzellen, die während der Behandlung gleiche Volumina von frischem RPMI-Medium erhielten.

### 2.2.6 Zellyse

Im Anschluss an die Medikamententestungen wurden die Zellen in Vorbereitung auf die Western-Blot-Analyse lysiert.

Nach 24 Stunden Medikamentenbehandlung wurde das Medium abgesaugt und durch 5 ml 4°C kaltes DPBS ersetzt. Die Zellen wurden mithilfe eines Zellschabers vom Boden gelöst und mit einer 10-ml-Pipette aufgenommen. Zur optimalen Dispersion wurden die Zellen wiederholt auf- und abpipettiert. Die Zellsuspension wurde in ein 15-ml-Falconröhrchen pipettiert und bei 4°C für 4 Minuten bei 1100 Umdrehungen pro Minute (ca. 217G) zentrifugiert. Danach wurde der Überstand abgesaugt, das Pellet in 120 µl Lysispuffer resuspendiert, auf Eis gelagert und über einen Zeitraum von 30 Minuten alle 10 Minuten

gründlich auf dem Schüttelgerät gemischt.

Abschließend wurde die Suspension erneut bei 4°C für 10 Minuten bei 5000 Umdrehungen pro Minuten (ca. 4480G) zentrifugiert, um den Zelldetritus aus der Lösung zu entfernen und eine möglichst reine Proteinsuspension zu gewinnen. Der Überstand wurde in Mikrozentrifugenröhrchen transferiert, passend beschriftet und bei minus 20°C gelagert.

### **2.2.7 Colorimetrische Proteinkonzentrationsbestimmung**

Die Proteinkonzentrationsbestimmung wurde mithilfe des „*Roti®-Quant universal Kits*“ der Firma Roth durchgeführt. Die Funktion dieses Kits beruht auf der Biuret-Reaktion.

Zweiwertige Kupferionen der Reagenzlösung bilden mit Verbindungen, die mehr als zwei Peptidbindungen enthalten, einen farbigen Komplex. Anschließend reduziert der in einem alkalischen Reaktionsmedium enthaltene „*Enhancer*“ die zweiwertigen Kupferionen zu einwertigem Kupfer. In der Lösung wird dies durch einen purpurfarbenen Farbumschlag sichtbar. Die entwickelten Komplexe konnten bei einer Wellenlänge von 492 nm gegen eine Standardkurve mit bovinem Serumalbumin (BSA) photometrisch gemessen werden. Die Erstellung der BSA-Standardkurve erfolgte nach Tabelle 4 der Gebrauchsanweisung der Firma Carl Roth GmbH. Der Konzentrationsbereich der Eichkurve reichte von 125 bis 2000 µg/ml einschließlich einer Kontrolle von 0 µg/ml.

Extinktion und Proteingehalt der Probe verhalten sich im Messbereich proportional zueinander, wodurch die Bestimmung des Gesamtproteins der Probe möglich wird (Roth 2009). Um die Proteinkonzentration der Lysate zu messen, wurden nach Protokoll des Herstellers die BSA-Konzentrationsreihe und 1:5-Verdünnungen der Proben in 3-facher Ausführung vorbereitet. Als Verdünnungsmedium wurde zweifach destilliertes Wasser verwendet. 50 µl der Standardkurve und 50 µl jeder zu messenden Probe wurden ebenfalls in dreifacher Ausführung in eine *96-Well-plate* pipettiert. 100 µl der Roti-Quant-Lösung (Roti-Quant-Reagenz 1 und Roti-Quant-Reagenz 2 im Verhältnis 15:1) wurden den 50 µl der verdünnten Proben und der Standardreihe hinzugegeben. Der Inhalt der *96-Well-plate* wurde vorsichtig gemischt und anschließend für 30 Minuten bei 37°C inkubiert. Die Proben wurden in Triplets bei 492 nm mit dem µQuant-Microplate-Spectrophotometer gemessen und mit dem Computerprogramm „*Mikrowin 2000*“ ausgewertet. Dieses zeigte die Konzentrationen der Lysate direkt in µg/ml an. Anschließend konnte mit der Western-Blot-Analyse begonnen werden.

### 2.2.8 Western-Blot-Analyse (Immunblot)

Die Western-Blot-Analyse ist eine analytische Methode, um bestimmte Proteine durch Antikörper-Bindung quantitativ nachweisen zu können.

Im Folgenden soll die Methode der Western-Blot-Analyse erläutert werden. Zunächst werden die Proteine der Probe per Gelelektrophorese aufgetrennt und anschließend auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Auf dieser Membran können sie durch spezifischen primären Antikörper detektiert werden, welcher an das zu identifizierende Antigen bindet (Towbin et al. 1979). Im nächsten Schritt bindet der sekundäre Antikörper an die Fc-Region des Primärantikörpers. Dieser ist mit einer Meerrettich-Peroxidase, auch HRP genannt (*horseradish peroxidase*), gekoppelt, welche ihrerseits eine Chemilumineszenzreaktion katalysiert. Die HRP wirkt dabei als Katalysator für die Umsetzung von Luminol in seine oxidierte Form. Diese Reaktion produziert eine Lumineszenz, die im Verhältnis zur Proteinmenge steht.

Ein sensitiver Röntgenfilm wird auf die Membran gelegt und der Lumineszenz ausgesetzt. Die Entwicklung des Röntgenfilms zeigt ein quantifizierbares Bild der Proteine auf dem Blot.

#### 2.2.8.1 Gelelektrophorese

Für die Western-Blot-Analyse mussten, um die Proben miteinander vergleichen zu können, gleiche Mengen an Proteinen aufgetragen werden. Für den Nachweis von APP sollten 15 µg Protein pro Fach aufgetragen werden. Das für die Menge von 15 µg benötigte Volumen wurde für jede Probe jeweils durch die Proteinkonzentrationsbestimmung errechnet. Die Lysate wurden zusammen mit gleichem Volumen des Ladepuffers (1:1), für 10 Minuten bei 95°C inkubiert. Anschließend wurde die Mischung auf Eis gelagert und kurz zentrifugiert, um das gesamte Volumen in der unteren Hälfte des Eppendorfgefäßes zu sammeln. Dies gewährleistete den vollständigen Transfer in die Gelkammern. Daraufhin wurde „VarioGel-Tricin-SDS“-Laufpuffer mit doppelt destilliertem Wasser in einer Verdünnung von 1:20 auf 500 ml angesetzt. Das Polyacrylamidfertiggel wurde aus dem Kühlschrank geholt, mit destilliertem Wasser gespült und in das „XCell-Sure-Lock“ eingesetzt. Anschließend wurde der Laufpuffer hinzugegeben.

Um SDS-Reste im Polyacrylamidfertiggel zu verringern, wurden die Gelfächer wiederholt mit dem Laufpuffer durchgespült. Die Proben und der Proteinstandard (*Spectra-Multicolor-Broad-Range-Protein-Ladder*) wurden in die Gelfächer des „VarioGel“ 4 bis 12 Prozent Polyacrylamid-Gradientenfertiggels pipettiert. Zunächst wurde, um alle Proteine auf eine

gleichmäßige Höhe zu bringen, für ca. 15 Minuten eine Spannung von 60 V angelegt. Anschließend wurde die Voltzahl für weitere 60 Minuten auf 150 V erhöht.

### **2.2.8.2 Blotten**

Nachdem die Proteine das Gel durchlaufen hatten, wurde die Western-Blot-Analyse-Kammer vorbereitet. Diese bestand aus 6 Schwämmchen, 2 Filterpapieren sowie einer Nitrozellulosemembran. Der Transferpuffer, der aus 20 ml Transferpufferkonzentrat (*VarioGel*), 100 ml Methanol und 380 ml doppelt destilliertem H<sub>2</sub>O bestand, wurde angemischt. Die Materialien wurden im Transferpuffer angefeuchtet. Die Western-Blot-Analyse-Kammer wurde mit drei Schwämmchen und einem Filterpapier belegt. Dann wurden die Materialien mit einer Glaspipette gefestigt, indem diese von der Mitte aus unter leichtem Druck über die Schwämme gerollt wurden. Das Gel und die Membran wurden aufgelegt. Darauf folgten erneut ein Filterpapier und drei Schwämmchen. Um die Proteine auf die Membran zu blotten, das heißt zu übertragen, wurde für 2 Stunden eine Spannung von 25 Volt angelegt.

### **2.2.8.3 Hinzugabe des Primärantikörpers**

Nach dem Blotten wurde die Membran mit einfach konzentrierter trisgepufferter Salzlösung mit 0,5 Prozent Tween 20 (1-mal) gewaschen. Anschließend wurden die Proteine auf der Membran durch eine 30 Sekunden dauernde Inkubierung mit Ponceau-S unspezifisch angefärbt. Diese Kontrolle konnte Luftblasen auf dem Blot oder das gänzliche Fehlen der Proteine sichtbar machen und damit den bisherigen Verlauf des Experiments überprüfen. Um die Membran vollständig von den Ponceau-S-Resten zu entfärben, wurde diese für 20 Minuten, mit einem Wechsel des TBS-T-Puffers nach 10 Minuten, gewaschen. Die Membran wurde anschließend für eine Stunde bei Raumtemperatur mit einem TBS-T-Puffer, in dem 10 Prozent Milchpulver gelöst wurde, blockiert, um die proteinaffine Membran weniger empfindlich für unspezifische Bindungen des Primärantikörpers zu machen.

Je nach Zielprotein wurden 10 ml der Antikörperlösung in folgenden Verdünnungen hergestellt:

<u>Antikörper</u>	<u>Konzentration</u>
W-02	1:5000
β-Aktin	1:5000
APLP2	1:3000
GRP78	1:1000
Anti-acetyliertes Histon 4	1:1000

Nach dem Blocken der Membran wurde diese über Nacht bei 4°C auf einem Schüttler mit 10 ml des passenden Antikörpers inkubiert.

#### **2.2.8.4 Hinzugabe des Sekundärantikörpers**

Am zweiten Tag wurde die Membran zweimal für jeweils 10 Minuten mit einfach konzentrierter trisgepufferter Salzlösung mit 0,5 Prozent Tween 20 (TBS-T 1x) gespült. Der Sekundärantikörper bindet an die Fc-Region des Primärantikörpers. Diese Region unterscheidet sich nach dem jeweiligen Tier, aus welchem der Primärantikörper gewonnen wurde. Daher muss der Sekundärantikörper passend zum Herstellungstier gewählt werden. Der Anti-Maus-Antikörper musste in einer Konzentration von 1:4000, der Anti-Hase-Antikörper in einer Konzentration von 1:3000 hergestellt werden. Bei einer Konzentration von 1:4000 wurden 3,75 µl Anti-Maus-Antikörper und 15 ml einfach konzentrierter TBS-T-Puffer in einem Falkongefäß gemischt. Um die Konzentration von 1:3000 beim Anti-Hase-Antikörper herzustellen, mussten 15 ml TBS-T und 5 µl des Sekundärantikörpers vermischt werden. Anschließend wurde die Membran für 2 Stunden bei Raumtemperatur mit dem polyklonalen Sekundärantikörper inkubiert. Dieser Antikörper bindet an mehrere Epitope der Fc-Region des Primärantikörpers und ruft damit eine Signalverstärkung des Proteinsignals hervor.

#### **2.2.8.5 Entwicklung der Western-Blot-Analyse**

Nach der Inkubationszeit wurde die Membran 3-mal für 10 Minuten mit einfach konzentriertem TBS-T gespült. Die folgenden Schritte wurden im Dunkelraum unter Rotlicht

als Lichtquelle durchgeführt: 10 ml Entwicklerlösung (siehe Absatz 2.1.3 Materialien und Chemikalien; Seite 14) wurde zum Blot gegeben. Diese wirkte für 2 Minuten ein. Dann wurde die Membran in die Entwicklungskassette übertragen. Der lichtsensitive Röntgenfilm wurde auf die Membran gelegt. Die Dauer der Belichtung des Filmes variierte zwischen 10 Sekunden und 5 Minuten, je nachdem wie stark das Signal des Sekundärantikörpers war. Die belichteten Röntgenfilme wurden mit der Entwicklermaschine Curix 60 der Firma Agfa entwickelt.

## **2.2.8.6 Auswertung der Ergebnisse**

### **2.2.8.6.1 Datenakquisition**

Um eine statistisch korrekte Quantifizierung zu gewährleisten, wurde jede Western-Blot-Analyse 3-mal durchgeführt. Nach Entwicklung der Röntgenfilme wurden diese mit dem Epson-Perfection-Scanner in einer Bildqualität von 600 dpi im JPEG-Format auf den Computer übertragen. Auf dem Computer wurde anschließend die Signalstärke der Proteinbanden ausgewertet: Dafür wurde das erhaltene JPEG-Bild mit dem „Open-Source“-Programm ImageJ geöffnet und nach der Anleitung „*Analyzing gels and western blots with ImageJ*“ (Miller 2010) ausgewertet. Die erhaltenen Integrationsdichtewerte wurden in eine Excel-Tabelle übertragen. Um die Proteinmengen untereinander vergleichen zu können und zudem zu visualisieren, dass gleiche Mengen an Proteinen in die Gelfächer eingesetzt wurden, wurde  $\beta$ -Aktin als Ladekontrolle verwendet. Aus den Integrationsdichtewerten der APP-Bande und der dazugehörigen  $\beta$ -Aktin Kontrolle wurden zur Auswertung folgende Quotienten gebildet.

Zur Analyse des gesamten Amyloid-Vorläufer-Proteins wurden folgende Quotienten gebildet: Integrationsdichtewerte der APP-Gesamtbande geteilt durch die Integrationsdichtewerte der  $\beta$ -Aktinbande. Um die unreife APP-Bande zu analysieren, wurden die Integrationsdichtewerte der unreifen APP-Bande durch die Integrationsdichtewerte der  $\beta$ -Aktinbande geteilt. Die reife APP-Bande wurde analysiert, indem die Integrationsdichtewerte der reifen APP-Bande durch die Integrationsdichtewerte der unreifen APP-Bande geteilt wurden.

### **2.2.8.6.2 Quantifizierung und statistische Auswertung**

*Die folgende Datenauswertung wurde mithilfe der freundlichen Beratung durch die Abteilung Medizinische Statistik der Universität Göttingen durchgeführt.*

Um die Signifikanzen mithilfe statistischer Berechnungen zu überprüfen, wurden die in Absatz 3.3 errechneten Quotienten in das Statistik- und Auswertungsprogramm „*GraphPad Prism*“ übertragen. Signifikante Unterschiede zwischen den verschiedenen

Medikamentenkonzentrationen wurden mit einer einfachen Varianzanalyse (ANOVA), gefolgt von einem Bonferroni-Post-Hoc-Test mit einem Konfidenzintervall von 95 Prozent ermittelt. Die Ausgabe der Daten erfolgte als Balkendiagramm, wobei jeder Balken das arithmetische Mittel der drei Werte einer Medikamentenkonzentration mit der Angabe des Standardfehlers darstellte. Die Signifikanzen wurden als Sternchen repräsentiert, wobei ein Sternchen (\*)  $p < 0.05$  entspricht, zwei Sternchen (\*\*)  $p < 0.01$  und drei Sternchen (\*\*\*)  $p < 0.001$  entsprechen.

## **3 Ergebnisse**

---

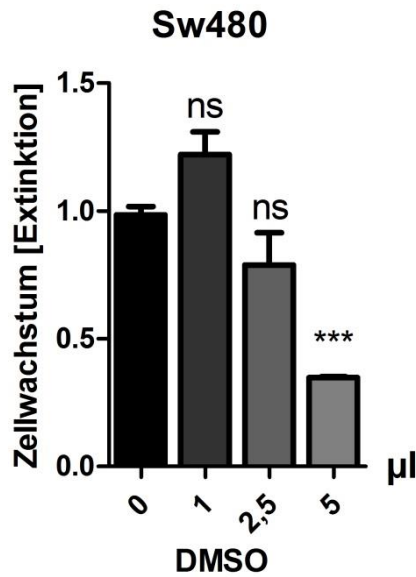
### **3.1 Proliferationsassay**

#### **3.1.1 Einfluss der Wirkung von DMSO auf die Proliferation**

Die in Pulverform vorliegenden Medikamente wurden in zelltoxischem Lösungsmittel (DMSO) gelöst. Um die proliferationsinhibierende Wirkung von DMSO auf die Zellen zu überprüfen, wurde ein Proliferationsassay mit unterschiedlichen Konzentrationen durchgeführt. Hierdurch konnte gezeigt werden, in welchem Ausmaß DMSO einen Einfluss auf die Proliferation hatte.

Im Folgenden sind die ermittelten Extinktionswerte und die durchgeführten statistischen Berechnungen grafisch dargestellt.





**Abbildung 1: Der Effekt von DMSO auf das Wachstum von Sw480**

Grafische Darstellung der Extinktionswerte als arithmetisches Mittel mit Standardfehler. Signifikanzen wurden mit einer einfachen Varianzanalyse (ANOVA), gefolgt von einem Bonferroni-Post-Hoc-Test (Konfidenzintervall 95 %) errechnet (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ; ns = nicht signifikant). Da die Extinktion proportional zur Anzahl lebender Zellen in der Kultur ist, können Aussagen über eine Proliferationsinhibierung ermittelt werden. DMSO wurde den Zellen in ansteigenden Konzentrationen hinzugegeben und diente damit der Überprüfung des zytotoxischen und proliferationshemmenden Effektes. Da die Fächer der *96-Well-plate* jeweils 100 µl Medium enthielten, konnten diese Mikroliterwerte annähernd als Prozentanteil des DMSO gesehen werden. Hier zeigte sich, dass erst  $< 2,5$  % (2,5 µl/100 µl) DMSO eine proliferationsinhibierende Wirkung eintrat. Diese Werte wurden bei einigen der durchgeführten Proliferationsassays erreicht, gekennzeichnet und der Auswertung entnommen. Der Effekt auf die Zellreihe BxPc3 waren vergleichbar (Daten nicht gezeigt).

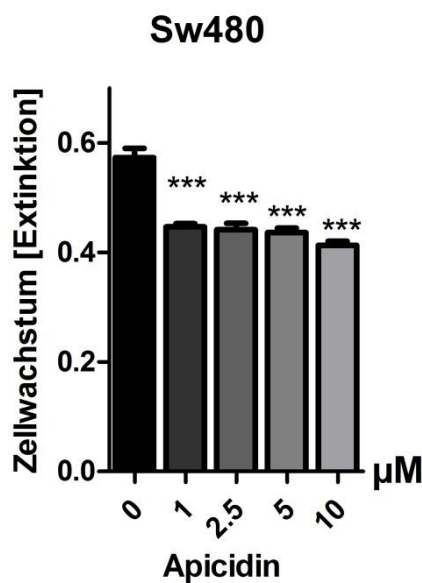
Nach Behandlung der Zellreihe Sw480 mit 1 µM DMSO stieg die Proliferation mit  $123,75 \pm 3,899$  Prozent auf einen erhöhten Wert. Bei einer Konzentration von 2,5 µM DMSO sank die Proliferation auf  $79,64 \pm 7,645$  Prozent. Nach Zugabe von 5 µM DMSO sank die Proliferation signifikant auf  $35,42 \pm 0,659$  Prozent. Somit zeigte sich eine deutliche Proliferationseinschränkung. Bis zu einer Konzentration von 2,5 µM DMSO im Medium zeigt das Lösungsmittel dagegen keinen signifikanten Einfluss auf die Proliferation. Ab 5 µM zeigte sich eine signifikante Inhibierung des Wachstums. Folglich konnte die gezeigte Proliferationsinhibierung der durchgeführten Proliferationsassays, welche DMSO-Konzentrationen über 2,5 Prozent enthielten, nicht alleine auf den getesteten HDAC-Inhibitor zurückgeführt werden. Diese Konzentration ist ausschließlich in der höchsten angewendeten Konzentration der Medikamente Scriptaid, Sirtinol und APHA-Compound 8 entstanden. Im Ergebnis- und Diskussionsteil wurden diese Werte erkenntlich gemacht und der Wertung entnommen.

### 3.1.2 Ergebnisse der Zellreihe Sw480

#### 3.1.2.1 Apicidin

Die Behandlung der Zellreihe Sw480 mit Apicidin in niedrigen Konzentrationen führte zu einer signifikanten Proliferationsinhibierung.

Nach Behandlung der Sw480-Zellen mit 1  $\mu\text{M}$  Apicidin sank die Proliferation auf  $78,10 \pm 1,536$  Prozent (Extinktionswert:  $0,447 \pm 0,005859$ ) und blieb bis zur höchsten Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  Apicidin nahezu konstant ( $72,07 \pm 0,7941$  Prozent; Extinktionswert:  $0,413 \pm 0,007965$ ).



**Abbildung 2: Der Effekt von Apicidin auf das Wachstum von Sw480**

Grafische Darstellung der Extinktionswerte als arithmetisches Mittel mit Standardfehler. Signifikanzen wurden mit einer einfachen Varianzanalyse (ANOVA), gefolgt von einem Bonferroni-Post-Hoc-Test (Konfidenzintervall 95 %) errechnet (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ). Da die Extinktion proportional zur Anzahl lebender Zellen in der Kultur war, konnten Aussagen über die Proliferationsinhibierung des Medikaments ermittelt werden.

**Apicidin inhibierte die Proliferation der Kolonkarzinomlinie Sw480 signifikant und bei einer niedrigen Dosis.** Die Zellen wurden 24 Stunden in steigenden Konzentrationen bis zu 10  $\mu\text{M}$  Medikament inkubiert. Die Inhibierung des Wachstums wurde mithilfe des MTS-Proliferationsassays bestimmt.

Abbildung 2 zeigt die Wachstumsinhibierung der Zellen bei zunehmender Konzentration des HDAC-Inhibitors Apicidin. Trotz steigender Konzentration sank die Proliferation im Verhältnis nur langsam. Die inhibierende Wirkung des Medikaments nahm zwischen 1 und 10  $\mu\text{M}$  nicht wesentlich zu.

### 3.1.2.2 Scriptaid

Die Behandlung von Sw480 mit Scriptaid führte zu einer signifikanten und konzentrationsabhängigen Proliferationsinhibierung. Scriptaid wirkte, ähnlich dem HDAC-Inhibitor Apicidin, in einer geringen Konzentrationen.

Nach Behandlung mit der geringsten Dosis Scriptaid (5  $\mu\text{M}$ ) sank die Proliferation der Zellreihe Sw480 auf  $70,91 \pm 0,9928$  Prozent (Extinktionswert:  $0,408 \pm 0,024$ ). Diesem Ergebnis zufolge entsprach Scriptaid damit ungefähr der Wirkstärke von Apicidin. Zwischen 5  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  Scriptaid bestand kein wesentlicher Unterschied in der Proliferation. 20  $\mu\text{M}$  Scriptaid inhibierten die Zellen auf  $55,28 \pm 1,199$  Prozent. Bei der höchsten Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  nahm die Proliferation auf  $44,81 \pm 0,6135$  Prozent (Extinktionswert:  $0,258 \pm 0,017$ ) ab.

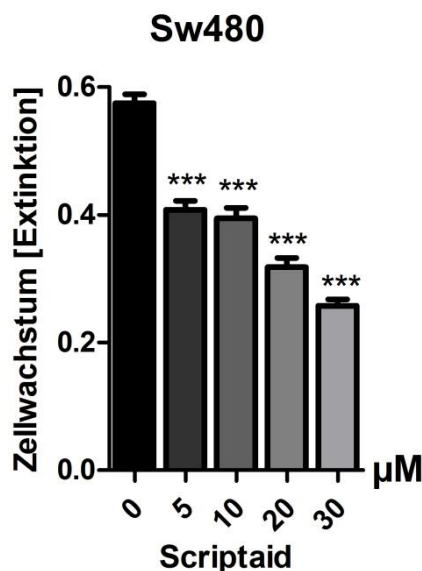


Abbildung 3: Der Effekt von Scriptaid auf das Wachstum von Sw480

Grafische Darstellung der Extinktionswerte als arithmetisches Mittel mit Standardfehler. Signifikanzen wurden mit einer einfachen Varianzanalyse (ANOVA), gefolgt von einem Bonferroni-Post-Hoc-Test (Konfidenzintervall 95 %) errechnet (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ). Da die Extinktion proportional zur Anzahl lebender Zellen in der Kultur war, konnten Aussagen über die Proliferationsinhibierung des Medikaments ermittelt werden.

**Scriptaid inhibierte die Proliferation der Kolonkarzinomlinie Sw480 signifikant und**

**konzentrationsabhängig.** Die Zellen wurden 24 Stunden in steigenden Konzentrationen bis zu 30  $\mu\text{M}$  Medikament inkubiert. Die Inhibierung des Wachstums wurde mithilfe des MTS-Proliferationsassays bestimmt. Umso stärker die Konzentration des Medikaments war, desto stärker wurde auch die Proliferation inhibiert.

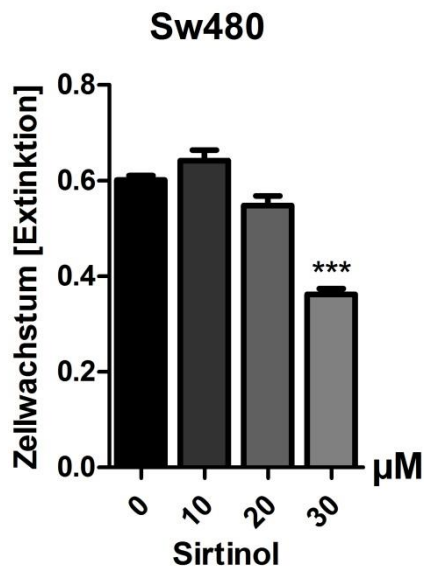
Abbildung 3 zeigt, dass bereits 5  $\mu\text{M}$  Scriptaid einen signifikanten Abfall der Proliferation von Sw480 bewirkten. Zwischen 5  $\mu\text{M}$  und 20  $\mu\text{M}$  nahm die Proliferation der Zellen weiter

ab. Ab 30  $\mu\text{M}$  Scriptaid war der Anteil an toxisch und proliferationshemmend wirkendem DMSO über dem in Kontrollassays ermittelten Grenzwert von 2,5 Prozent. Folglich konnte die Proliferationsinhibierung von  $44,81 \pm 0,6135$  Prozent (Extinktionswert:  $0,258 \pm 0,017$ ) bei dieser Konzentration (30  $\mu\text{M}$ ) nicht mehr alleine der Wirkung von Scriptaid zugeschrieben werden.

### 3.1.2.3 Sirtinol

Die Behandlung von Sw480 mit Sirtinol führte zu keiner signifikanten Proliferationsinhibierung.

Nach Behandlung der Zellreihe Sw480 mit 10  $\mu\text{M}$  Sirtinol stieg die Proliferation mit  $106,71 \pm 2,263$  Prozent auf einen erhöhten Wert (Extinktionswert:  $0,642 \pm 0,0215$ ). Dagegen sank diese nach Gabe von 20  $\mu\text{M}$  Sirtinol auf  $91,02 \pm 1,934$  Prozent (Extinktionswert:  $0,548 \pm 0,01991$ ) ab. Ab einer Konzentration von 60  $\mu\text{M}$  wurden Extinktionswerte von  $0,362 \pm 0,01179$  gemessen, die einer Proliferation von  $60,34 \pm 2,821$  Prozent gegenüber dem Ausgangswert entsprechen.



**Abbildung 4: Der Effekt von Sirtinol auf das Wachstum von Sw480**

Grafische Darstellung der Extinktionswerte als arithmetisches Mittel mit Standardfehler. Signifikanzen wurden mit einer einfachen Varianzanalyse (ANOVA), gefolgt von einem Bonferroni-Post-Hoc-Test (Konfidenzintervall 95 %) errechnet (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ). Da die Extinktion proportional zur Anzahl lebender Zellen in der Kultur war, konnten Aussagen über die Proliferationsinhibierung des Medikaments ermittelt werden.

**Sirtinol inhibierte die Proliferation der Kolonkarzinomlinie Sw480 signifikant und**

**konzentrationsabhängig, aber erst bei höheren Konzentrationen.** Die Zellen wurden 24 Stunden in steigenden Konzentrationen bis zu 30 µM Sirtinol inkubiert. Die Inhibierung des Wachstums wurde mithilfe des MTS-Proliferationsassays bestimmt. Zwischen 10 und 20 µM zeigte sich keine proliferationsinhibierende Wirkung. Im Vergleich zu Apicidin und Scriptaid wirkte Sirtinol auf Sw480 in niedrigen Konzentrationen nicht. Sirtinol wirkte im Gegensatz zu Apicidin und Scriptaid erst bei hohen Konzentrationen proliferationsinhibierend.

Eine signifikante Proliferationsinhibierung konnte durch Sirtinol bei der Zellreihe Sw480 mit 10 und 20 µM nicht erreicht werden. 20 µM Scriptaid zeigte bei Sw480 mit  $91,02 \pm 1,934$  Prozent noch keine nennenswerte Inhibierung. Bei der höchsten Konzentration konnte man den Effekt wiederum aufgrund der hohen DMSO-Konzentration nicht alleine dem Medikament zuordnen.

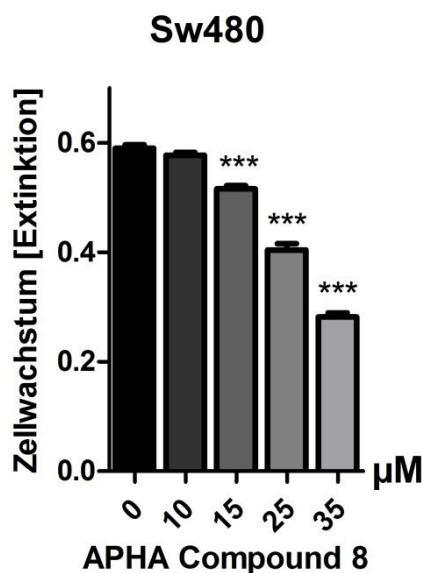
Ab 30 µM war die Proliferation um  $60,34 \pm 2,821$  Prozent (Extinktionswert:  $0,3623 \pm 0,01179$ ) inhibiert. Hier lag die DMSO-Konzentration über 2,5 Prozent. Die Proliferation von Sw480 wurde erst unter so hohen Medikamentenkonzentrationen inhibiert,

dass der Einfluss von DMSO und die Medikamentenwirkung schwer unterschieden werden konnten.

### 3.1.2.4 APHA-Compound 8

Die Behandlung von Sw480 mit APHA-Compound 8 führte zu einer signifikanten und konzentrationsabhängigen Proliferationsinhibierung. APHA-Compound 8 wirkte im Vergleich zu den HDAC-Inhibitoren Apicidin und Scriptaid jedoch erst bei höheren Konzentrationen.

Bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  war nur eine geringe Proliferationsinhibierung ( $97,89 \pm 1,898$  Prozent) zu erkennen. Bei steigender Konzentration nahm die Proliferation jedoch weiter ab. Bei 15  $\mu\text{M}$  APHA-Compound 8 fiel die Proliferation auf  $87,55 \pm 1,822$  Prozent, nach Gabe von 25  $\mu\text{M}$  weiter auf  $68,45 \pm 1,402$  Prozent und bei einer Konzentration von 35  $\mu\text{M}$  sogar auf  $47,79 \pm 0,9697$  Prozent.



**Abbildung 5: Der Effekt von APHA-Compound 8 auf das Wachstum von Sw480**

Grafische Darstellung der Extinktionswerte als arithmetisches Mittel mit Standardfehler. Signifikanzen wurden mit einer einfachen Varianzanalyse (ANOVA), gefolgt von einem Bonferroni-Post-Hoc-Test (Konfidenzintervall 95 %) errechnet (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ). Da die Extinktion proportional zur Anzahl lebender Zellen in der Kultur war, konnten Aussagen über die Proliferationsinhibierung des Medikaments ermittelt werden.

**APHA-Compound 8 inhibierte die Proliferation der Kolonkarzinomlinie Sw480 signifikant und konzentrationsabhängig, jedoch erst bei höheren Konzentrationen.** Die Zellen wurden 24 Stunden in steigenden Konzentrationen bis zu 35  $\mu\text{M}$  APHA-Compound 8 inkubiert. Die Inhibierung des Wachstums wurde mithilfe des MTS-Proliferationsassays bestimmt. Die proliferationsinhibierende Wirkung dieses Medikaments ähnelte von der Wirkungsstärke her derjenigen von Sirtinol.

Im Vergleich zum HDAC-Inhibitor Sirtinol inhibierte APHA-Compound 8 die Proliferation von Sw480 konzentrationsabhängig. Die Proliferation wurde im Gegensatz zu Apicidin und Scriptaid aber erst bei höheren Dosen signifikant inhibiert. Erst bei Zugabe von 15  $\mu\text{M}$  APHA-Compound 8 kam es zu einer signifikanten Proliferationsinhibierung von  $87,55 \pm 1,822$  Prozent (Extinktionswert:  $0,5163 \pm 0,005840$ ). 25  $\mu\text{M}$  des Medikaments inhibierten die Proliferation auf  $68,45 \pm 1,402$  (Extinktionswert:  $0,4040 \pm 0,01206$ ). Bei einer Konzentration von 35  $\mu\text{M}$  war die Wirkung von DMSO auf die Zellen nicht mehr von der Wirkung des Medikaments abzugrenzen, da die DMSO-Konzentration über 2,5 Prozent lag. Der konzentrationsabhängige Wirkmechanismus des Medikaments konnte dennoch gezeigt werden.

### **3.1.3 Ergebnisse der Zellreihe BxPc3**

#### **3.1.3.1 Apicidin**

BxPc3-Zellen zeigten unter der Behandlung mit niedrigen Konzentrationen Apicidins eine konzentrationsabhängige Proliferationsinhibierung.

Schon unter einer Konzentration von 1  $\mu\text{M}$  Apicidin wurde die Proliferation der BxPc3-Zellen auf  $88,79 \pm 1,657$  Prozent (Extinktionswert:  $0,5957 \pm 0,007055$ ) inhibiert. Die Proliferation nahm mit steigender Apicidindosis konzentrationsabhängig ab. Die höchste verwendete Apicidinkonzentration inhibierte BxPc3 auf  $70,83 \pm 2,511$  Prozent (Extinktionswert  $0,4750 \pm 0,01411$ ).

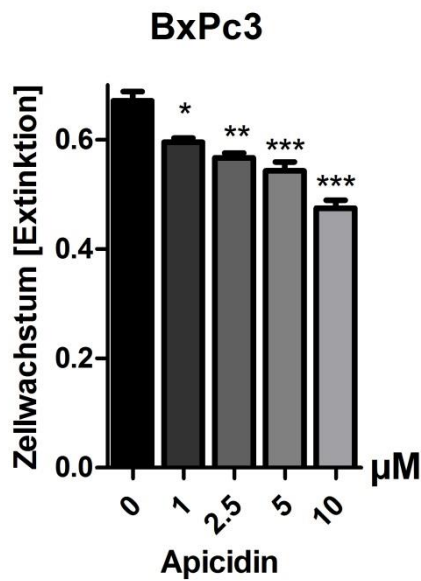


Abbildung 6: Der Effekt von Apicidin auf das Wachstum von BxPc3

Grafische Darstellung der Extinktionswerte als arithmetisches Mittel mit Standardfehler. Signifikanzen wurden mit einer einfachen Varianzanalyse (ANOVA), gefolgt von einem Bonferroni-Post-Hoc-Test (Konfidenzintervall 95 %) errechnet (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ). Da die Extinktion proportional zur Anzahl lebender Zellen in der Kultur war, konnten Aussagen über die Proliferationsinhibierung des Medikaments ermittelt werden.

**Apicidin inhibierte die Proliferation der Pankreaskarzinomzelllinie BxPc3 konzentrationsabhängig und signifikant. Bereits unter einer geringen Dosis zeigte sich die proliferationsinhibierende Wirkung.** Die Zellen wurden 24 Stunden in steigenden Konzentrationen mit bis zu 10 µM des Medikaments inkubiert. Die Inhibierung des Wachstums wurde mithilfe des MTS-Proliferationsassays bestimmt.

Abbildung 6 zeigt die konzentrationsabhängige und signifikante Proliferationsinhibierung von Apicidin auf BxPc3. Apicidin inhibierte die Proliferation bereits unter der geringsten eingesetzten Konzentration von 1 µM signifikant. Mit Steigerung der Medikamentenkonzentration erhöhte sich der proliferationsinhibierende Effekt. Diese Ergebnisse deuten auf eine dem Medikament zuzuweisende Eigenschaft hin, die es ermöglicht, die Proliferation der Zellreihe Sw480 bereits unter geringen Konzentrationen einzuschränken.

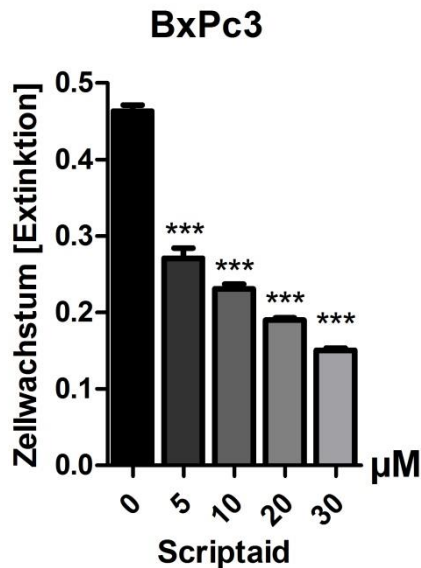
### 3.1.3.2 Scriptaid

Die Behandlung von BxPc3-Zellen mit Scriptaid führte zu einer signifikanten und konzentrationsabhängigen Proliferationsinhibierung. Scriptaid wirkte, ähnlich dem HDAC-Inhibitor Apicidin, bereits bei Einsatz von geringen Konzentrationen.

BxPc3 reagierte mit einer deutlichen Proliferationsabnahme auf den HDAC-Inhibitor



Scriptaid. Die Proliferation wurde bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  auf  $58,41 \pm 2,177$  Prozent (Extinktionswert:  $0,2707 \pm 0,01357$ ) inhibiert. Nach Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  sank die Proliferation weiter auf  $49,81 \pm 0,8021$  Prozent ab. Die Proliferation wurde somit halbiert. 30  $\mu\text{M}$  Scriptaid inhibierte die Proliferation weiter auf  $32,51 \pm 1,225$  Prozent (Extinktionswert:  $0,1503 \pm 0,003180$ ).



**Abbildung 7: Der Effekt von Scriptaid auf das Wachstum von BxPc3**

Grafische Darstellung der Extinktionswerte als arithmetisches Mittel mit Standardfehler. Signifikanzen wurden mit einer einfachen Varianzanalyse (ANOVA), gefolgt von einem Bonferroni-Post-Hoc-Test (Konfidenzintervall 95 %) errechnet (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ). Da die Extinktion proportional zur Anzahl lebender Zellen in der Kultur war, konnten Aussagen über die Proliferationsinhibierung des Medikaments ermittelt werden.

**Scriptaid inhibierte die Proliferation der Pankreaskarzinomzelllinie BxPc3 signifikant und konzentrationsabhängig.** Die Zellen wurden 24 Stunden in steigenden Konzentrationen mit bis zu 30  $\mu\text{M}$  des Medikaments inkubiert. Die Inhibierung des Wachstums wurde mithilfe des MTS-Proliferationsassays bestimmt.

In Abbildung 7 wird ersichtlich, dass die Proliferationsinhibierung von Scriptaid bei der Zelllinie BxPc3 schon bei einer Konzentration von wenig Mikromol wirksam war. Unter Verwendung einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  wurde die Proliferation sogar hochsignifikant auf knapp zwei Drittel des Ausgangswerts inhibiert. Nach Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  Scriptaid wurde die Proliferation signifikant auf  $49,81 \pm 0,8021$  Prozent gesenkt, eine Konzentration von 20  $\mu\text{M}$  inhibierte die Proliferation noch weiter.

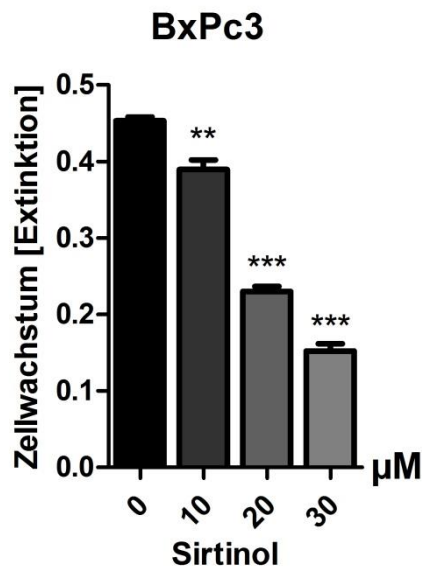
Bei einer Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  Scriptaid war der Anteil an toxisch und proliferationshemmend wirkendem DMSO der vorangegangenen Pharmatestung nach über dem ermittelten Grenzwert von 2,5 Prozent. Somit konnte auch hier nicht ausgeschlossen

werden, dass der Wert von  $32,51 \pm 1,225$  Prozent (Extinktionswert:  $0,1503 \pm 0,003180$ ) von DMSO beeinflusst wurde. Dennoch zeigte sich im Experiment ein hochsignifikanter und konzentrationsabhängiger Proliferationsrückgang, der der alleinigen Wirkung von Scriptaid zugerechnet werden kann.

### **3.1.3.3 Sirtinol**

Im Gegensatz zur Behandlung der Zellreihe Sw480 führte die Behandlung von BxPc3 mit Sirtinol zu einer signifikanten und konzentrationsabhängigen Proliferationsinhibierung.

Die Proliferation der Zellreihe BxPc3 sank bei Verwendung von  $10 \mu\text{M}$  Sirtinol auf  $85,97 \pm 2,987$  Prozent (Extinktionswert:  $0,389 \pm 0,01267$ ). Bei einer Konzentration von  $20 \mu\text{M}$  Sirtinol sank die Proliferation ungefähr die Hälfte – auf  $50,79 \pm 1,589$  Prozent (Extinktionswert:  $0,230 \pm 0,006506$ ). Bei  $30 \mu\text{M}$  Sirtinol wurden Extinktionswerte von  $0,152 \pm 0,009597$  gemessen, die einer Proliferation von  $33,61 \pm 1,896$  Prozent gegenüber dem Ausgangswert entsprechen.



**Abbildung 8: Der Effekt von Sirtinol auf das Wachstum von BxPc3**

Grafische Darstellung der Extinktionswerte als arithmetisches Mittel mit Standardfehler. Signifikanzen wurden mit einer einfachen Varianzanalyse (ANOVA), gefolgt von einem Bonferroni-Post-Hoc-Test (Konfidenzintervall 95 %) errechnet (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ). Da die Extinktion proportional zur Anzahl lebender Zellen in der Kultur war, konnten Aussagen über die Proliferationsinhibierung des Medikaments ermittelt werden.

**Sirtinol inhibierte die Proliferation der Pankreaskarzinomzelllinie BxPc3 signifikant und**

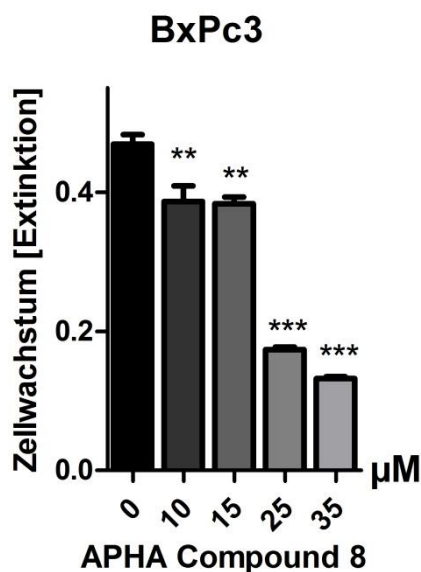
**konzentrationsabhängig.** Die Zellen wurden 24 Stunden in steigenden Konzentrationen mit bis zu 30 µM des Medikaments inkubiert. Die Inhibierung des Wachstums wurde mithilfe des MTS-Proliferationsassays bestimmt.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen mit der Zellreihe Sw480 inhibierte Sirtinol die Zelllinie BxPc3 konzentrationsabhängig schon ab einer Konzentration von 10 µM ( $85,97 \pm 2,987$  Prozent; Extinktionswert:  $0,389 \pm 0,01267$ ). Bei einer Konzentration von 20 µM halbierte sich die Proliferation auf  $50,79 \pm 1,589$  Prozent (Extinktionswert:  $0,230 \pm 0,006506$ ). Nach Zugabe von 30 µM Sirtinol sank die Proliferation weiter auf  $33,61 \pm 1,896$  Prozent, wobei eine Beeinflussung durch DMSO nicht ausgeschlossen werden konnte, da bei der Konzentration von 30 µM die DMSO-Konzentration über 2,5 Prozent lag. Dennoch konnte eine wachstumshemmende und konzentrationsabhängige Wirkung von Sirtinol auf die Zellreihe BxPc3 gezeigt werden.

### 3.1.3.4 APHA-Compound 8

Die Behandlung von BxPc3 mit APHA-Compound 8 führte zu einer signifikanten und konzentrationsabhängigen Proliferationsinhibierung.

Bei einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  APHA-Compound 8 zeigte sich eine Proliferationsinhibierung auf  $82,54 \pm 5,535$  Prozent. Unter steigender Medikamentenkonzentration nahm die Proliferation weiter ab. Nach Zugabe von 15  $\mu\text{M}$  APHA-Compound 8 fiel die Proliferation auf  $81,84 \pm 3,475$  Prozent. Unter der APHA-Compound 8-Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  fiel die Proliferation stark auf  $37,15 \pm 1,561$  Prozent ab. Bei der höchsten getesteten Konzentration (35  $\mu\text{M}$ ) lag die Proliferation bei  $28,18 \pm 1,096$  Prozent.



**Abbildung 9: Der Effekt von APHA-Compound 8 auf das Wachstum von BxPc3**

Grafische Darstellung der Extinktionswerte als arithmetisches Mittel mit Standardfehler. Signifikanzen wurden mit einer einfachen Varianzanalyse (ANOVA), gefolgt von einem Bonferroni-Post-Hoc-Test (Konfidenzintervall 95 %) errechnet (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ). Da die Extinktion proportional zur Anzahl lebender Zellen in der Kultur war, konnten Aussagen über die Proliferationsinhibierung des Medikaments ermittelt werden.

**APHA-Compound 8 inhibierte die Proliferation der Pankreaskarzinomzelllinie BxPc3 signifikant und konzentrationsabhängig.** Die Zellen wurden 24 Stunden in steigenden Medikamentenkonzentrationen bis zu 35  $\mu\text{M}$  APHA Compound 8 inkubiert. Die Inhibierung des Wachstums wurde mithilfe des MTS-Proliferationsassays bestimmt.

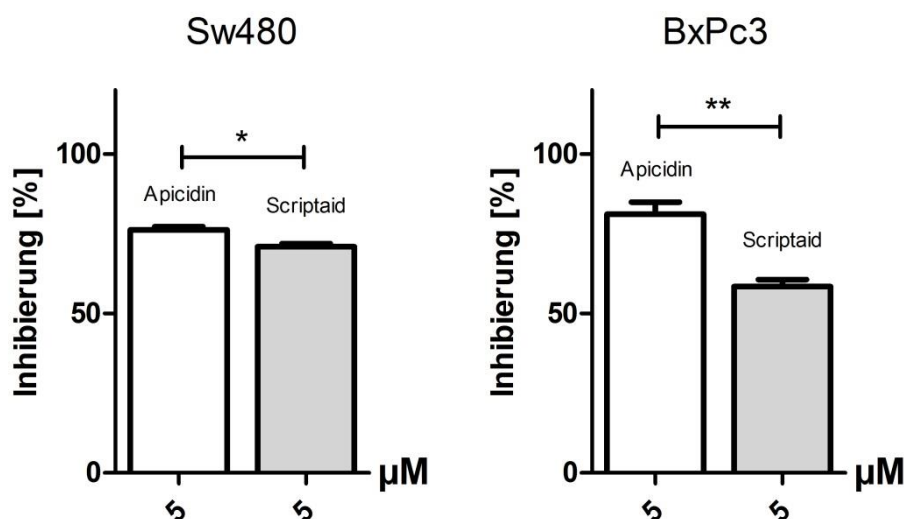
BxPc3-Zellen wurden ab einer Konzentration von 10  $\mu\text{M}$  APHA-Compound 8 signifikant auf  $82,54 \pm 5,535$  Prozent inhibiert. Die Inhibierung durch 15  $\mu\text{M}$  APHA-Compound 8 blieb mit  $81,84 \pm 3,475$  Prozent annähernd gleich. Auffallend war die starke Proliferationsabnahme zwischen 15 und 25  $\mu\text{M}$  APHA-Compound 8. Bei der Konzentration von 25  $\mu\text{M}$  lag die Proliferation bei  $37,15 \pm 1,561$  Prozent. Unter der höchsten verwendeten Konzentration von 35  $\mu\text{M}$  war die Proliferation stark inhibiert und lag bei  $28,18 \pm 1,096$  Prozent. In dieser

Konzentration war der Anteil an DMSO wiederum über 2,5 Prozent, womit die Zunahme der Proliferationshemmung auch durch die zytotoxische Wirkung des Lösungsmittels beeinflusst worden sein könnte. Zusammenfassend zeigte sich eine konzentrationsabhängige Proliferationsinhibierung, auch bei geringeren Dosen, die der Wirkung von APHA-Compound 8 zugeordnet werden kann.

### 3.1.4 Vergleich der Wirkung von Apicidin und Scriptaid

Apicidin und Scriptaid wirkten bei geringen Konzentrationen proliferationsinhibierend.

Um die Wirkungen beider Substanzen zu vergleichen und die potentere Substanz in Bezug auf ihre Wachstumshemmung von Sw480 und BxPc3 zu identifizieren, wurden die ermittelten Ergebnisse bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  in Prozentwerten verglichen. Die Ergebnisse wurden in einem Säulendiagramm dargestellt. Signifikanzen wurden mit einem t-Test für unverbundene Stichproben (Konfidenzintervall 95 Prozent) errechnet.



**Abbildung 10: Vergleich der Wirkung von Apicidin und Scriptaid (5  $\mu\text{M}$ ) auf Sw480 und BxPc3**

Um die unterschiedlichen Messwerte miteinander vergleichen zu können, wurden die errechneten Prozentwerte der 5- $\mu\text{M}$ -Konzentrationsreihe gegenübergestellt (Extinktionswert im Verhältnis zur Abnahme der Kontrollen [100 %] in Prozent) Diese Prozentwerte wurden als arithmetische Mittel mit Standardfehler dargestellt.

Signifikanzen wurden mit einem t-Test für unverbundene Stichproben (Konfidenzintervall 95 %) errechnet (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ).

**Scriptaid inhibierte die Proliferation der Kolonkarzinomlinie Sw480 und der Pankreaskarzinomzelllinie BxPc3 im Bereich von fünf Mikromol jeweils signifikant besser als Apicidin.** Die Wirkstärke von Sirtinol war in Bezug auf die Proliferationshemmung beider Zelllinien höher.

In der Behandlung von Sw480 zeigte sich bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  zwischen beiden Medikamenten nur ein geringer Unterschied. Die Proliferation war unter 5  $\mu\text{M}$  Apicidin auf  $76,15 \pm 1,04$  Prozent gefallen. Dem standen  $70,91 \pm 0,9928$  Prozent unter Einfluss von 5  $\mu\text{M}$

Scriptaid gegenüber. Trotz geringen Unterschieden ergab sich nach statistischer Berechnung ein signifikanter Unterschied. Scriptaid konnte eine höhere Potenz in der Konzentration von 5  $\mu$ M zugeordnet werden. Bei gleicher Konzentration inhibierten beide Medikamente die Zellreihe BxPc3 in einem größeren Ausmaß als die Zellreihe Sw480. BxPc3-Zellen zeigten unter Apicidinbehandlung einen Abfall der Proliferation auf  $81,05 \pm 3,809$  Prozent. Unter Scriptaidbehandlung wurde die Proliferation auf  $58,41 \pm 2,177$  Prozent gesenkt. Dies zeigt, dass BxPc3-Zellen empfindlicher auf das Medikament reagierten.

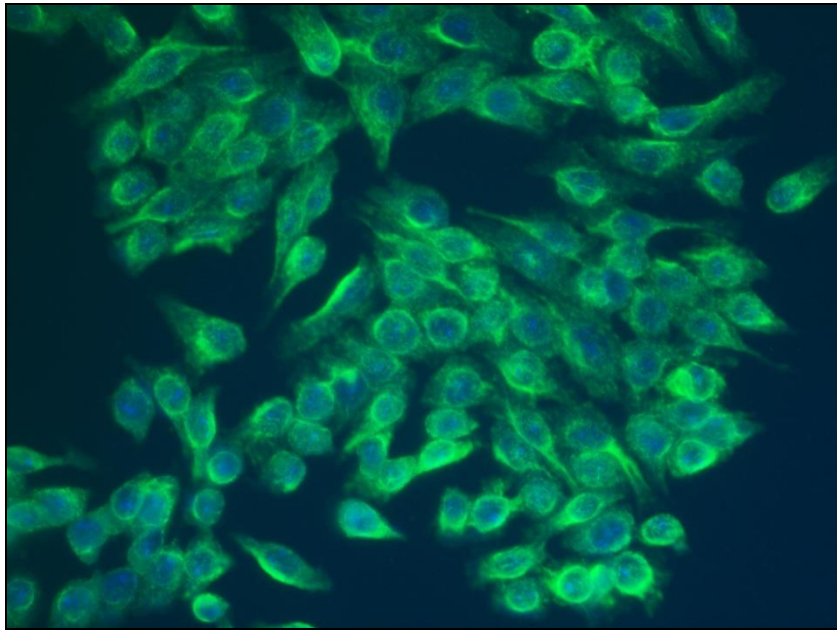
Zusammenfassend konnte gezeigt werden, dass Scriptaid sowohl bei Sw480- als auch bei BxPc3-Zellen signifikant wirksamer proliferationshemmender war als Apicidin.

## **3.2 Immunfluoreszenz**

### **3.2.1 Ergebnisse der Zellreihe Sw480 unter Apicidineinfluss**

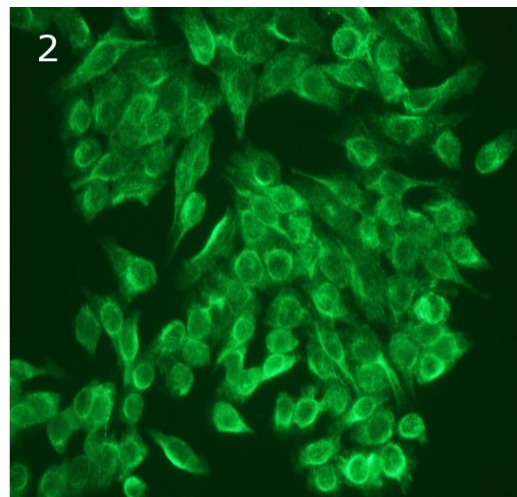
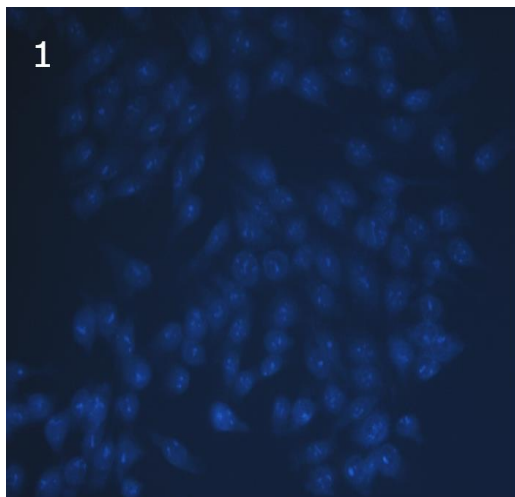
Die APP-Konzentration der Kolonkarzinomzelllinie Sw480 nahm unter Apicidinzugabe ab.

Abbildung 11 zeigt das Amyloid-Vorläufer-Protein in einem repräsentativen Ausschnitt der mittels Immunfluoreszenz gefärbten Zellen. Diese Zellprobe wurde nicht mit Apicidin behandelt und diente als Kontrolle. Das Amyloid-Vorläufer-Protein zeigt sich grün angefärbt, die Zellkerne erscheinen blau gefärbt. Die APP-Konzentration zeigte sich in einer gleichmäßigen Grünfärbung.



**Abbildung 11:** Der repräsentative Ausschnitt der Immunfluoreszenzfärbung zeigt das Amyloid-Vorläufer-Protein (grün) in Methanol fixierten Sw480-Kolonkarzinomzellen **ohne Medikamentenbehandlung**.

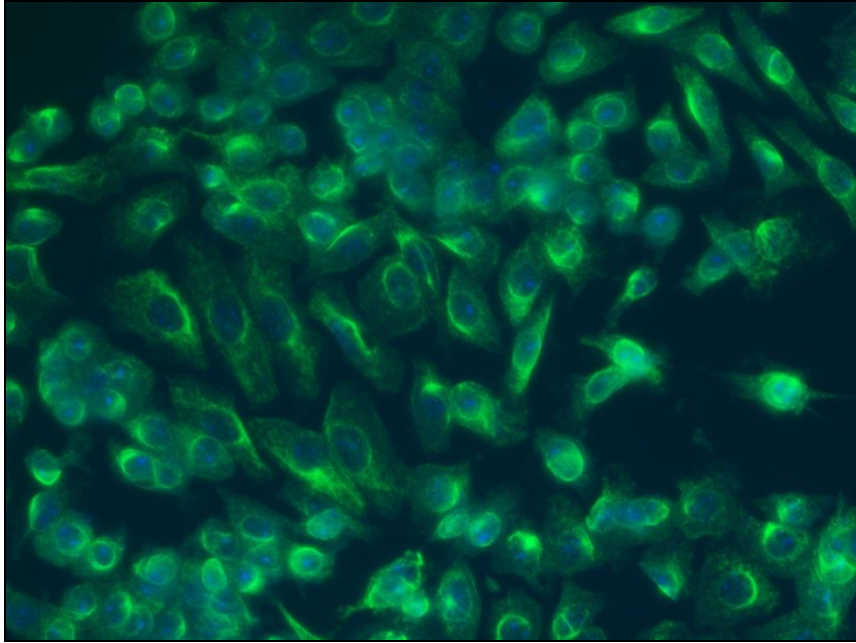
Das Überlagerungsbild ist mithilfe von ImageJ aus den Fluoreszenzbildern 12.1 und 12.2 entstanden. **Die Zellkerne sind blau dargestellt.**



**Abbildung 12.1 und 12.2: Immunfluoreszenzbilder ohne Medikamente**

Abbildung 12.1 zeigt die DAPI-Färbung der Sw480-Zellen, in der die Zellkerne angefärbt sind.

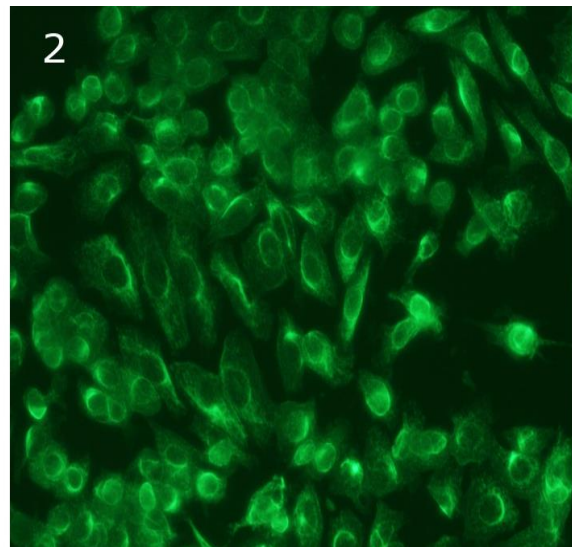
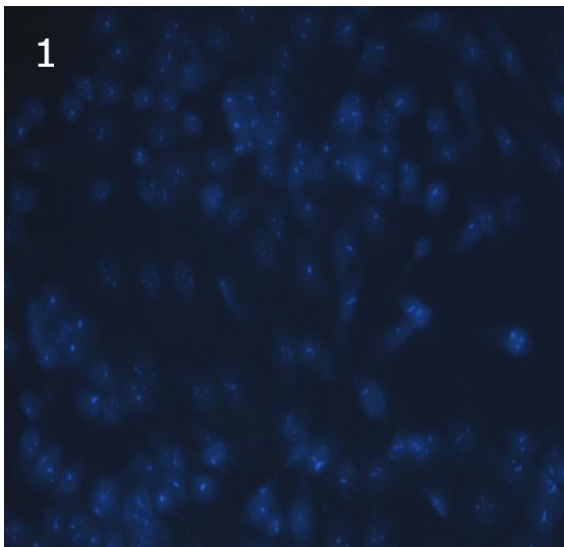
Abbildung 12.2 zeigt das mit dem Antikörper 22C11 (1:100) gefärbte APP der Sw480-Zellen.



**Abbildung 13:** Der repräsentative Ausschnitt der Immunfluoreszenzfärbung zeigt das Amyloid-Vorläufer-Protein in Methanol fixierten Sw480-Kolonkarzinomzellen nach 24-stündiger Inkubation mit **5  $\mu\text{M}$  Apicidin**.

Im Gegensatz zur Kontrolle zeigt sich – bei gleichen Aufnahmebedingungen – ein Intensitätsverlust der grünen Fluoreszenz, spricht des gefärbten APP.

Das Überlagerungsbild ist mithilfe von ImageJ aus den Fluoreszenzbilder 14.1 und 14.2 entstanden. **Die Zellkerne sind blau dargestellt.**

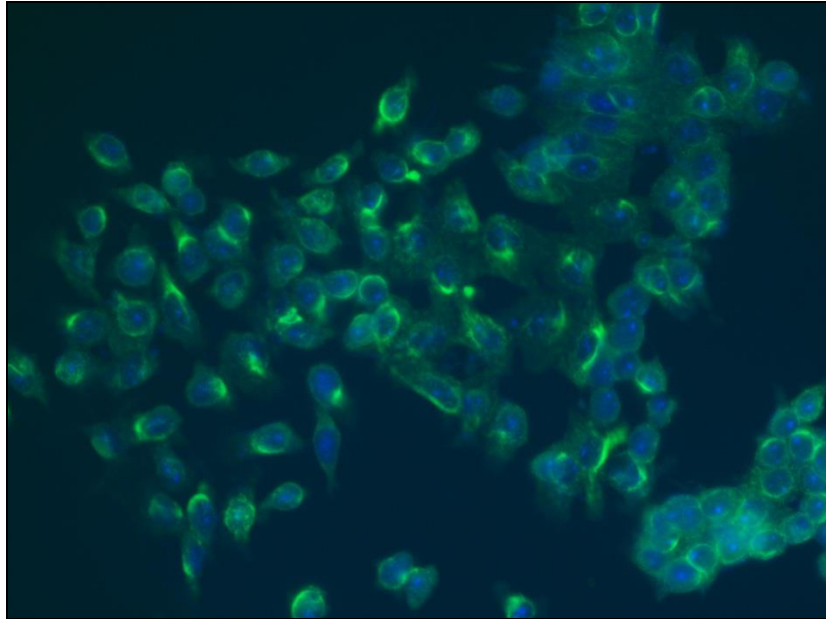


**Abbildung 14.1 und 14.2:** Immunfluoreszenzbilder nach Inkubation mit **5  $\mu\text{M}$  Apicidin** für 24 Stunden

**Abbildung 14.1** zeigt die DAPI-Färbung der Sw480-Zellen, in der die Zellkerne angefärbt sind.

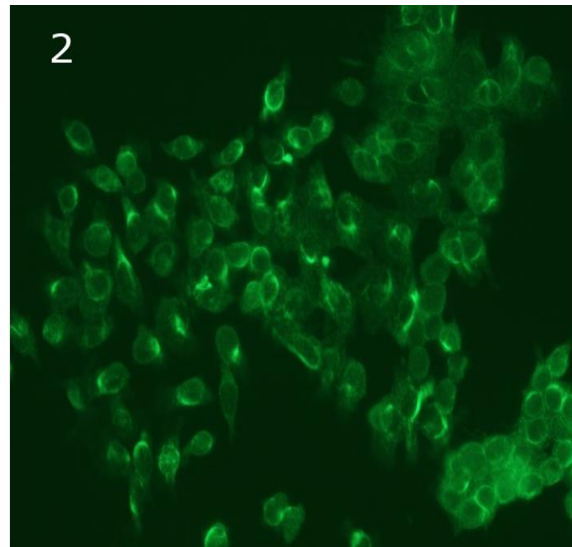
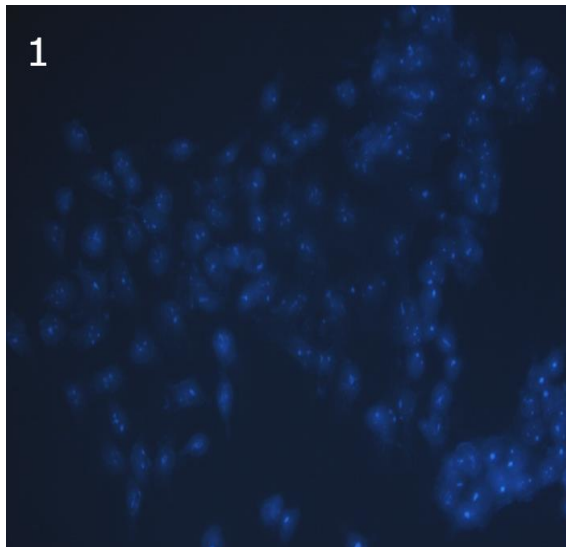
**Abbildung 14.2** zeigt das mit dem Antikörper 22C11 (1:100) gefärbte APP der Sw480-Zellen.



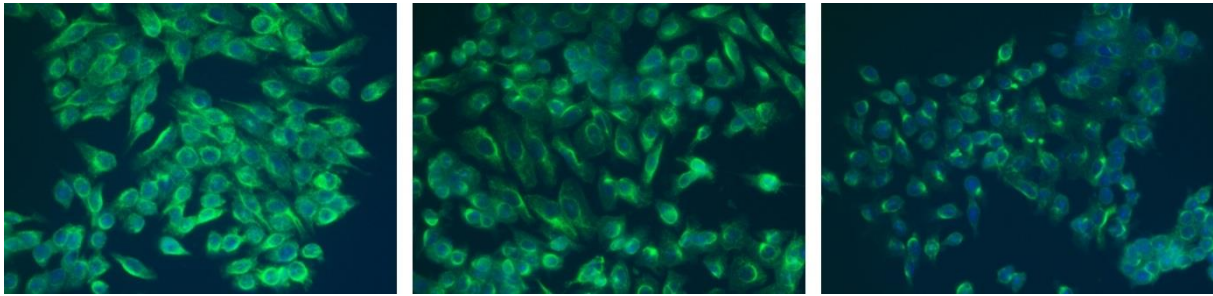


**Abbildung 15:** Der repräsentative Ausschnitt zeigt das Amyloid-Vorläufer-Protein in Methanol fixierten Sw480-Kolonkarzinomzellen nach 24-stündiger Inkubation mit **10 µM Apicidin**.

Im Vergleich zur Kontrolle und der Behandlung mit 5 µM nimmt die Intensität des Fluoreszenzsignals unter einer Konzentration von 10 µM weiter ab. Das Überlagerungsbild ist mithilfe von ImageJ aus den Fluoreszenzbilder 16.1 und 16.2 entstanden. **Die Zellkerne sind blau dargestellt.**



**Abbildung 16.1 und 16.2: Immunfluoreszenzbilder nach Inkubation mit 10 µM Apicidin für 24 Stunden**  
**Abbildung 16.1 zeigt die DAPI-Färbung der Sw480 Zellen, in der die Zellkerne angefärbt sind.**  
**Abbildung 16.2 zeigt das mit dem Antikörper 22C11 (1:100) gefärbte APP der Sw480-Zellen.**



**Abbildung 17:** Von links nach rechts: Vergleichende Darstellung von Abbildung 11, Abbildung 13 und Abbildung 15. Die Abschwächung des grünen Fluoreszenzsignals (APP) bei zunehmender Apicidinkonzentration in der Zelllinie Sw480 stellt die Abnahme der APP-Konzentration dar.

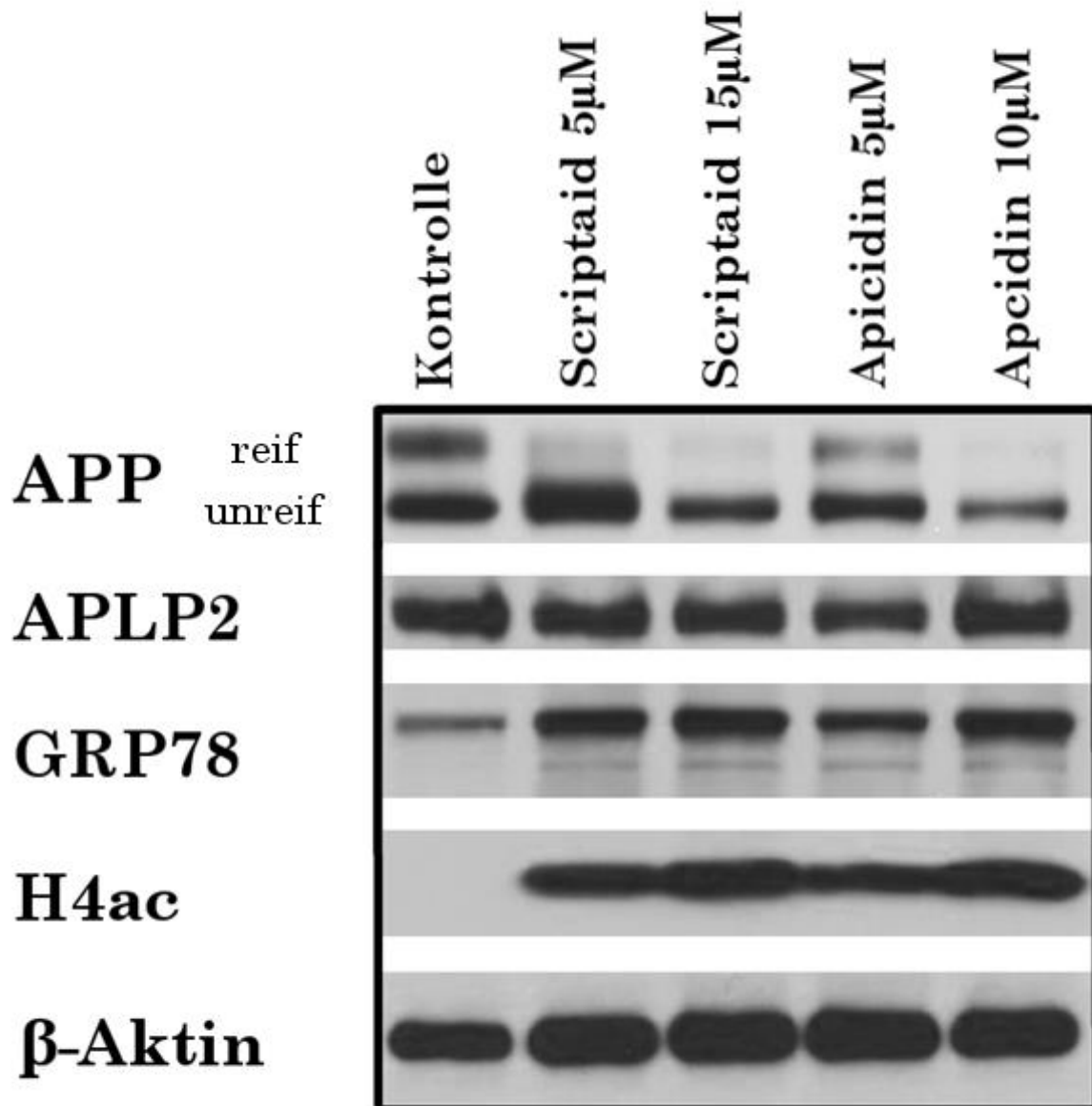
Die Ergebnisse der Immunfluoreszenz zeigen, dass der HDAC-Inhibitor Apicidin einen deutlichen Effekt auf das APP-Level der Zellen hat. Die oben dargestellten Fotos bilden jeweils einen repräsentativen Ausschnitt der mittels Immunfluoreszenz angefärbten Zellen ab, welche über einen Zeitraum von 24 Stunden mit 0  $\mu\text{M}$ , 5  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  Apicidin behandelt wurden. Alle Aufnahmen wurden unter den gleichen Bedingungen und mit identischer Belichtungszeit aufgenommen. Die Fotos zeigen deutlich, dass es mit steigender Konzentration von Apicidin zu einem Intensitätsverlust der grünen Fluoreszenz kommt. Dieser Fluoreszenzverlust war schon bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  (Abbildung 13) erkennbar. In der Abbildung 17 ist der konzentrationsabhängige Effekt des Medikaments gut zu erkennen. Zudem zeigt sich, dass sich die Morphologie der Zellen unter der Behandlung mit 10  $\mu\text{M}$  Apicidin veränderte. Die Zellen erschienen kleiner, das Zytoplasma verringerte sich. Auch die Fluoreszenz der Zellen nahm im Vergleich zur Behandlung mit 5  $\mu\text{M}$  Apicidin weiter ab.

### 3.3 Western-Blot-Analyse

#### 3.3.1 Ergebnisse der Behandlung mit Apicidin oder Scriptaid

Die Reifung des Amyloid-Vorläufer-Proteins wird durch Apicidin und Scriptaid inhibiert.

Die Ergebnisse der Western-Blot-Analysen standen im Einklang mit denen des Proliferationsassay sowie der Immunfluoreszenz. Alle Methoden zeigten eindeutig, dass die eingesetzten HDAC-Inhibitoren Einfluss auf die APP-Konzentration der Tumorzelllinien nehmen.



**Abbildung 18: Einfluss der HDAC-Inhibitoren Scriptaid und Apicidin auf reifes und unreifes APP, APLP2, GRP78 und H4ac. Als Ladekontrolle diente  $\beta$ -Aktin.**

Sw480-Zellen wurden für 24 Stunden mit steigenden Konzentrationen von Scriptaid und Apicidin behandelt. Die Zellysate wurden für die Western-Blot-Analyse mit Antikörpern gegen APP, APLP2, GRP78, H4ac und  $\beta$ -Aktin gefärbt und ausgewertet. Die Proteinkonzentration von APP, GRP78 und H4ac zeigte eine medikamenten- und dosisabhängige Regulierung. So führte sowohl die Scriptaid- als auch die Apicidinbehandlung zu einer Hochregulierung von H4ac und GRP78. APP wurde dagegen herunter reguliert. APLP2 (*amyloid precursor-like protein 2*) blieb als Mitglied der Amyloid-Vorläufer-Protein-Familie und als APP-homologes Protein unverändert.

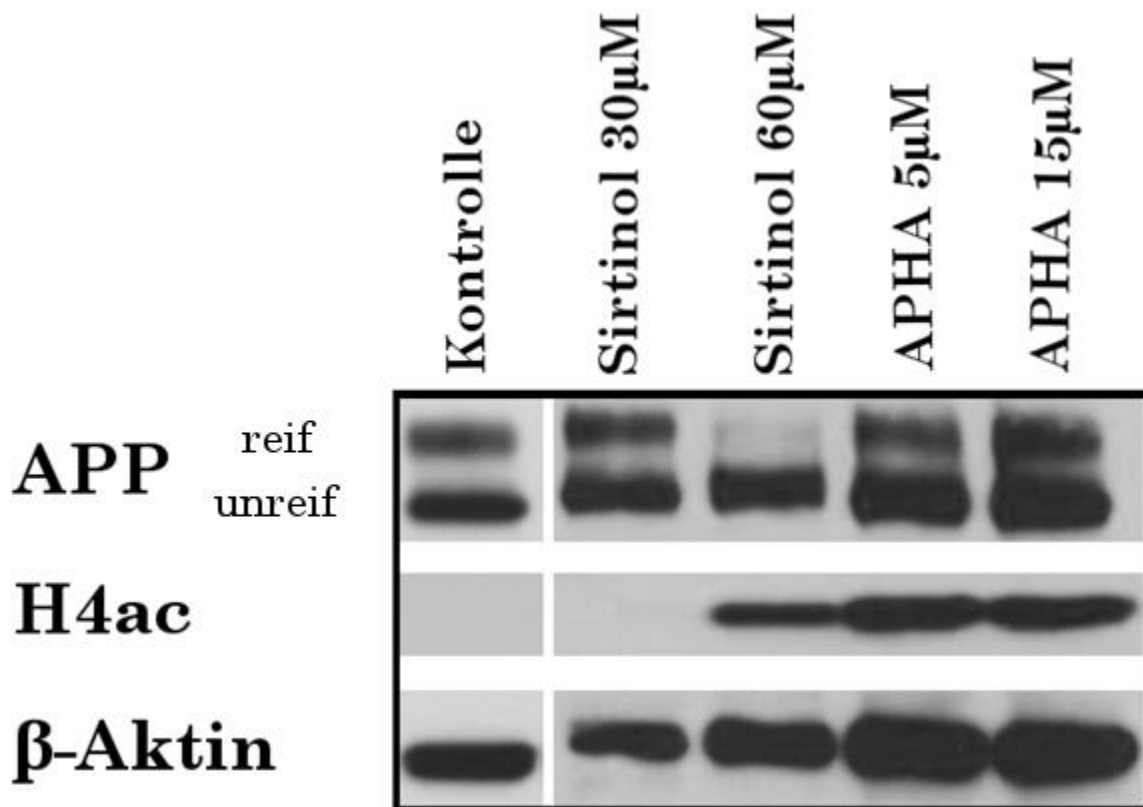
Nach Behandlung der Zellen mit einer 5- $\mu\text{M}$ -Lösung von Scriptaid nahm die reife Bande des Amyloid-Vorläufer-Proteins im Vergleich zur Bande der Kontrolle ab. Im Gegenzug nahm die Intensität der Bande des unreifen APP nach der Behandlung mit 5  $\mu\text{M}$  Scriptaid an Intensität zu. Nach Zugabe von 15  $\mu\text{M}$  Scriptaid war die reife APP-Bande kaum mehr sichtbar. Bei dieser Medikamentenkonzentration nahm auch die Bande des unreifen APP ab. Unter Behandlung mit einer 5- $\mu\text{M}$ -Lösung von Apicidin sank die Konzentration an unreifem APP im Vergleich zur Kontrolle ebenfalls. Dagegen stieg die Konzentration von unreifem APP im Unterschied zu der Behandlung mit Scriptaid nicht wesentlich an. Nach Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  Apicidin war die Bande des reifen APP mit bloßen Augen kaum noch sichtbar. Die unreife APP-Bande hatte im Bezug zur Behandlung mit 5  $\mu\text{M}$  weiter an Intensität verloren. Um zu zeigen, dass die Behandlung der HDAC-Inhibitoren Apicidin und Scriptaid spezifisch auf APP wirkte, wurde das zu APP homologe APLP2 untersucht. Auf dieses nahmen die Medikamente selbst bei höchsten Konzentrationen (10  $\mu\text{M}$  Apicidin und 15  $\mu\text{M}$  Scriptaid) keinen Einfluss. Die gleichmäßige APLP2-Konzentration zeigte somit die selektive Wirkung der Medikamente auf das Amyloid-Vorläufer-Protein.

Die Konzentration des APP-bindenden GRP78 erhöhte sich erwartungsgemäß unter der Behandlung: Eine Behandlung mit 5  $\mu\text{M}$  Scriptaid zeigte eine deutliche Steigerung der GRP78-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle. Nach der Zugabe von 15  $\mu\text{M}$  Scriptaid zeigte sich die GRP78-Konzentration weiterhin erhöht, stieg im Vergleich zu 5  $\mu\text{M}$  aber nicht wesentlich an.

Dagegen zeigte sich unter der Behandlung mit Apicidin eine konzentrationsabhängige Wirkung des HDAC-Inhibitors auf GRP78. Nach der Zugabe von 5  $\mu\text{M}$  Apicidin stieg die GRP78-Konzentration im Vergleich zur Kontrolle. Nach der Zugabe von 10  $\mu\text{M}$  Apicidin nahm die Intensität der GRP78-Bande weiter zu. Die Banden der  $\beta$ -Aktin-Färbung blieben bei allen Proben unverändert und zeigten folglich eine gleichmäßige Proteinbeladung der Geltaschen an.

### 3.3.2 Ergebnisse der Behandlung mit Sirtinol oder APHA-Compound 8

APHA-Compound 8 inhibierte die APP-Reifung nicht wesentlich. Sirtinol inhibierte die Reifung unter Einsatz einer hohen Dosierung.



**Abbildung 19: Einfluss der HDAC-Inhibitoren Sirtinol und APHA-Compound 8 (in Abbildung als APHA abgekürzt) auf reifes und unreifes APP und H4ac. Als Ladekontrolle diente  $\beta$ -Aktin.**

Sw480-Zellen wurden für 24 Stunden mit steigenden Konzentrationen von Sirtinol oder APHA-Compound 8 behandelt. Die Zelllysate wurden durch Western-Blot-Analyse mit Antikörpern gegen APP, H4ac und  $\beta$ -Aktin analysiert. Unter der Sirtinolkonzentration von 60  $\mu$ M sank die Proteinkonzentration von APP bei gleichzeitiger Zunahme der Proteinkonzentration vom hyperacetylierten Histon H4. Das Medikament APHA-Compound 8 erhöhte bei steigender Konzentration die Proteinkonzentration von H4ac. Die APP-Konzentration blieb unverändert.

Bei einer Konzentration von 30  $\mu$ M Scriptaid zeigte sich weder eine Hyperacetylierung noch eine eingeschränkte APP-Reifung. Sirtinol wies in der Western-Blot-Analyse erst bei einer Konzentration von 60  $\mu$ M eine Abnahme des reifen APP auf. Eine Hyperacetylierung des Histons H4 trat bei dieser Konzentration, passend zur Reifungsinhibierung, auf. Der Einfluss des zytotoxischen DMSO auf die APP-Reifung und auch die Hyperacetylierung des Histons

H4 war bei solch einer hohen Konzentration nicht auszuschließen.

APHA-Compound 8 zeigte im Proliferationsassay nur einen geringen Einfluss auf die Proliferation der Zelllinie Sw480. Mit diesen Ergebnissen einhergehend zeigte auch die Behandlung mit APHA-Compound 8 keinen Effekt auf die APP-Konzentration. Histon H4 hingegen wurde bei einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  und 15  $\mu\text{M}$  hyperacetyliert.

Auf weitere Untersuchungen der Medikamente und eine Quantifizierung der Wirkung auf die APP-Konzentration wurde verzichtet. Die gewonnenen Ergebnisse zeigten in gewünscht niedriger Dosis der Medikamente keine Hinweise auf eine wesentliche Beeinflussung der APP-Konzentration.

### **3.3.3 Quantitative Auswertung**

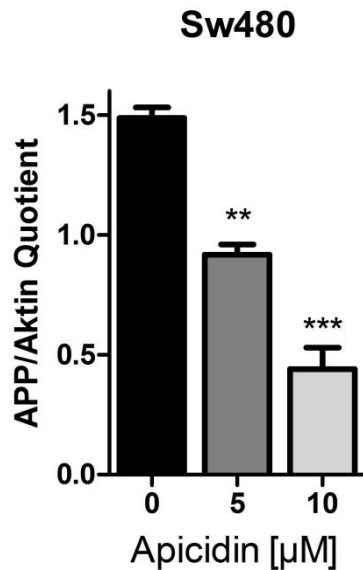
Um den Effekt der beiden APP-inhibierend wirkenden Medikamente Apicidin und Scriptaid auf reifes und unreifes APP in der Zelllinie Sw480 genau zu quantifizieren, wurde eine quantitative Auswertung von insgesamt drei Western-Blot-Analysen durchgeführt. Der Effekt der Medikamente auf reifes APP wurde berechnet, indem die Intensität der APP-Bande in jeder Western-Blot-Analyse gemessen wurde. Dargestellt wurden die Ergebnisse als Verhältnis zur Intensität der Aktinkontrolle. Mit der gleichen Methode wurde der Effekt der Medikamente auf reifes APP überprüft: Die Intensität des reifen APP wurde als Verhältnis zur Intensität des unreifen APP berechnet und anschließend grafisch dargestellt. Zur Quantifizierung des unreifen APP wurden die Intensitätswerte des unreifen APP als Verhältnis zu den Werten der Aktinkontrolle berechnet.

Signifikanzen wurden mit einer einfachen Varianzanalyse (ANOVA), gefolgt von einem Bonferroni-Post-Hoc-Test (Konfidenzintervall 95 Prozent) errechnet. Anhand dieser Ergebnisse konnte der Einfluss der Medikamente auf die Reifung des Amyloid-Vorläufer-Proteins exakt bestimmt werden.

#### **3.3.3.1 Ergebnisse der Behandlung mit Apicidin**

Apicidin senkte das gesamte APP-Level sowie die reife und die unreife Form von APP signifikant.

Die grafische Darstellung der Ergebnisse in Abbildung 20 zeigt die Quotienten und den arithmetischen Mittelwert, unter Angabe des Standardfehlers.

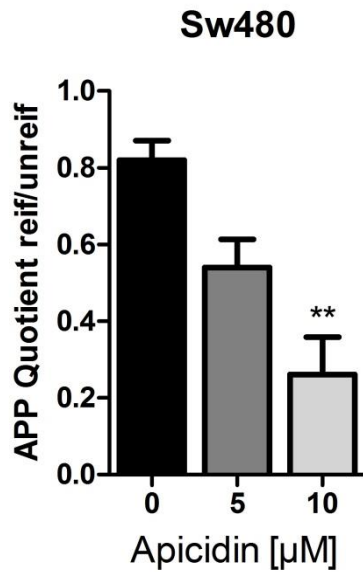


**Abbildung 20: Darstellung des APP-β-Aktin-Quotienten nach densitometrischen Messungen der Gesamt-APP(110-130kDa)- und β-Aktin(42kDa)-Bande.**

**Apicidin regulierte die gesamte APP-Proteinkonzentration der Zelllinie Sw480 konzentrationsabhängig und signifikant herunter.**

Drei Western-Blot-Analysen wurden mit ImageJ densitometrisch ausgemessen. Anschließend wurde der Quotient von APP zu β-Aktin gebildet. Die Ergebnisse wurden als arithmetische Mittel mit Standardfehler dargestellt. Signifikanzen wurden mit einer einfachen Varianzanalyse (ANOVA), gefolgt von einem Bonferroni-Post-Hoc-Test (Konfidenzintervall 95 %) errechnet (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ).

Abbildung 20 stellt den APP-β-Aktin-Quotienten dar. Nach Behandlung mit 5 µM Apicidin sank die APP-Konzentration signifikant von  $1,488 \pm 0,04346$  auf  $0,9172 \pm 0,0432$ , was einer Abnahme der APP-Konzentration von 38,36 Prozent entspricht. Nach Behandlung mit 10 µM Apicidin fiel die Konzentration signifikant weiter auf  $0,4406 \pm 0,1545$  ab (29,61 Prozent). Die Ergebnisse zeigen deutlich, dass das reife und unreife Amyloid-Vorläufer-Protein nach Zugabe des Medikaments abnimmt. Dieses Ergebnis steht im Einklang mit den quantitativen Ergebnissen der durchgeführten Western-Blot-Analysen sowie der Immunfluoreszenz.

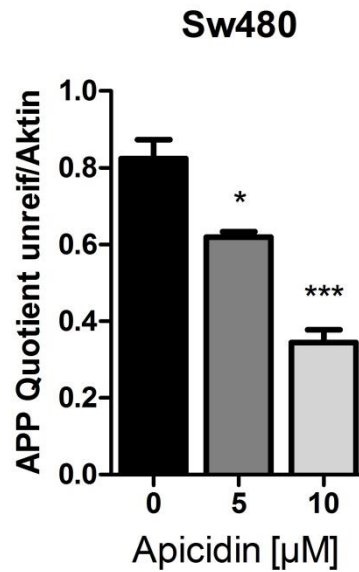


**Abbildung 21: Darstellung des Quotienten von reifem (130kDa) und unreifem (110kDa) APP unter Einfluss steigender Konzentrationen des HDACi Apicidin.**

**Apicidin reguliert reifes APP konzentrationsabhängig herunter.**

Drei Western-Blot-Analysen wurden mit ImageJ densitometrisch ausgemessen. Anschließend wurde der Quotient vom reifen zu unreifen APP gebildet. Dieser wurde als arithmetische Mittel mit Standardfehler dargestellt. Signifikanzen wurden mit einer einfachen Varianzanalyse (ANOVA), gefolgt von einem Bonferroni-Post-Hoc-Test (Konfidenzintervall 95 %) errechnet (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ).

Abbildung 21 zeigt den Quotienten von reifem (130kDa) zu unreifem (110kDa) APP, dargestellt in einem Balkendiagramm. Der Quotient von reifem zu unreifem APP nahm von unbehandelt  $0,8193 \pm 0,05111$  auf  $0,5402 \pm 0,07282$  unter der Behandlung mit  $5 \mu\text{M}$  Apicidin ab. Dies entspricht einer Abnahme von 24,84 Prozent. Unter Verwendung von  $10 \mu\text{M}$  Apicidin fiel die Konzentration des reifen APP signifikant auf 41,79 Prozent ab (Quotient reif/unreif  $0,2611 \pm 0,09735$ ). Hieraus lässt sich schließen, dass Apicidin das reife APP konzentrationsabhängig verringerte, also in die Reifung des Amyloid-Vorläufer-Proteins einzugreifen vermochte.



**Abbildung 22: Darstellung des Quotienten von unreifem APP (110kDa) zu  $\beta$ -Aktin (42kDa) unter Einfluss von steigenden Konzentrationen des HDACi Apicidin.**

**Apicidin reguliert unreifes APP konzentrationsabhängig herunter.**

Drei Western-Blot-Analysen wurden mit ImageJ densitometrisch ausgemessen. Anschließend wurde der Quotient von unreifen APP zu  $\beta$ -Aktin gebildet. Diese wurde als arithmetische Mittel mit Standardfehler dargestellt. Signifikanzen wurden mit einer einfachen Varianzanalyse (ANOVA), gefolgt von einem Bonferroni-Post-Hoc-Test (Konfidenzintervall 95 %) errechnet (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ).

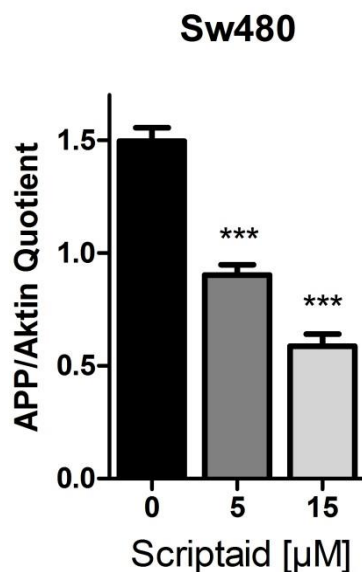


Abbildung 22 stellt den Quotienten von unreifem APP (110kDa) zu  $\beta$ -Aktin (42kDa) dar. Dieses nahm unter Apicidineinfluss konzentrationsabhängig vom Kontrollwert  $0,8238 \pm 0,04909$  (0  $\mu$ M) über  $0,6192 \pm 0,01393$  unter Behandlung mit 5  $\mu$ M auf letztendlich  $0,3443 \pm 0,0331$  unter Zugabe von 10  $\mu$ M Apicidin signifikant ab. Dies entsprach einer Inhibierung auf 31,87 Prozent des Ausgangswertes. Zusammenfassend inhibierte Apicidin auch das unreife, in der Bildung befindliche APP.

### 3.3.3.2 Ergebnisse der Behandlung mit Scriptaid

Scriptaid senkte sowohl die reife als auch die unreife Form von APP signifikant.

Zur Auswertung der Ergebnisse der Versuche mit Scriptaid wurde nach der gleichen Methode vorgegangen, die auch zur Auswertung der Versuche mit Apicidin verwendet wurde. Die Intensitätswerte der Banden der Western-Blot-Analysen wurden densitometrisch gemessen. Von diesen Werten wurden wiederum die Quotienten gebildet. Die grafische Darstellung der Ergebnisse in Form eines Balkendiagramms zeigt die Quotienten mit Angabe des arithmetischen Mittelwerts sowie des Standardfehlers.

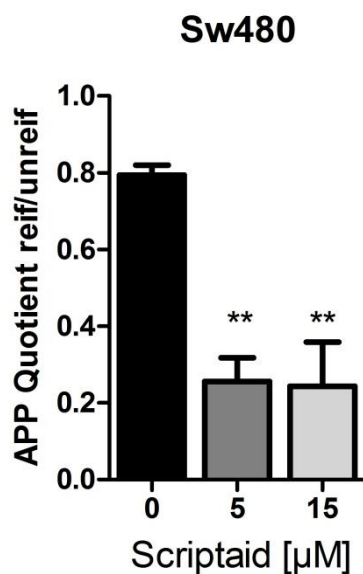


**Abbildung 23: Darstellung des APP- $\beta$ -Aktin-Quotienten nach densitometrischen Messungen der Gesamt-APP(110-130kDa)- und  $\beta$ -Aktin(42kDa)-Bande.**

**Scriptaid regulierte die Gesamt-APP-Proteinkonzentration der Zelllinie Sw480 konzentrationsabhängig und signifikant herunter.**

Drei Western-Blot-Analysen wurden mit ImageJ densitometrisch ausgemessen. Anschließend wurde der Quotient der Ergebnisse von APP zu  $\beta$ -Aktin gebildet. Dieser wurde als arithmetisches Mittel unter Angabe des Standardfehlers dargestellt. Signifikanzen wurden mit einer einfachen Varianzanalyse (ANOVA), gefolgt von einem Bonferroni-Post-Hoc-Test (Konfidenzintervall 95 %) errechnet (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ).

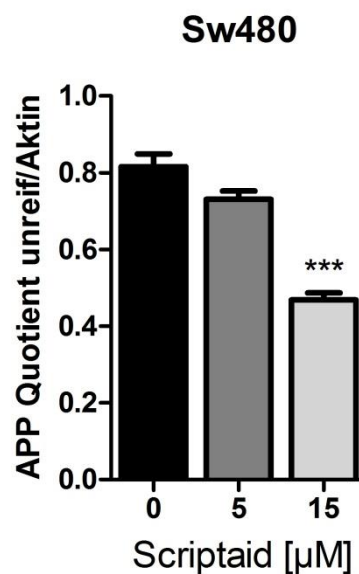
Der HDAC-Inhibitor Scriptaid zeigte einen mit Apicidin vergleichbaren Effekt auf das Amyloid-Vorläufer Protein. Abbildung 23 stellt den APP- $\beta$ -Aktin-Quotienten nach Behandlung mit Scriptaid in Konzentrationen von 0  $\mu$ M, 5  $\mu$ M und 15  $\mu$ M dar. Nach Behandlung der Zellen mit 5  $\mu$ M Scriptaid nahm das Gesamt-APP im Vergleich zur Kontrolle signifikant ab (Kontrolle:  $1,495 \pm 0,05886$ ; 5  $\mu$ M Scriptaid:  $0,9022 \pm 0,04530$ ). Eine höhere Dosis von 15  $\mu$ M Scriptaid senkte das Gesamt-APP weiter signifikant auf 39,22 Prozent herab (Quotient von  $0,5864 \pm 0,05389$ ).



**Abbildung 24: Darstellung des Quotienten von reifem (130kDa) und unreifem (110kDa) APP unter Einfluss von steigenden Konzentrationen des HDACi Scriptaid.**

**Scriptaid reguliert reifes APP herunter.**

Drei Western-Blot-Analysen wurden mit ImageJ densitometrisch ausgemessen. Anschließend wurde der Quotient vom reifen zu unreifen APP gebildet. Dieser wurde als arithmetisches Mittel mit Standardfehler dargestellt. Signifikanzen wurden mit einer einfachen Varianzanalyse (ANOVA), gefolgt von einem Bonferroni-Post-Hoc-Test (Konfidenzintervall 95 %) errechnet (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ).



**Abbildung 25: Darstellung des Quotienten von unreifem APP (110kDa) zu  $\beta$ -Aktin (42kDa) unter Einfluss von steigenden Konzentrationen des HDACi Scriptaid.**

**Scriptaid reguliert unreifes APP herunter.**

Drei Western-Blot-Analysen wurden mit ImageJ densitometrisch ausgemessen. Anschließend wurde der Quotient vom unreifen APP zu  $\beta$ -Aktin gebildet. Dieser wurde als arithmetisches Mittel mit Standardfehler dargestellt. Signifikanzen wurden mit einer einfachen Varianzanalyse (ANOVA), gefolgt von einem Bonferroni-Post-Hoc-Test (Konfidenzintervall 95 %) errechnet (\*,  $p < 0.05$ ; \*\*,  $p < 0.01$ ; \*\*\*,  $p < 0.001$ ).

Auch für Scriptaid wurde der Quotient von reifem (130kDa) und unreifem (110kDa) APP errechnet. Hiermit lässt sich das reife APP beurteilen.

Der Quotient nahm, wie bei den Versuchen mit Apicidin, vom Kontrollwert  $0,7937 \pm 0,02608$  (= 100 Prozent) auf  $0,2564 \pm 0,06086$  (= 32,30 Prozent) nach 5  $\mu\text{M}$  Scriptaid stark und signifikant ab. Zwischen 5  $\mu\text{M}$  und 15  $\mu\text{M}$  veränderte sich das reife APP nicht mehr wesentlich. Es sank von 32,30 Prozent (5  $\mu\text{M}$ ) auf 30,68 Prozent (10  $\mu\text{M}$ ). Diese Ergebnisse zeigen, dass 5  $\mu\text{M}$  Scriptaid die Reifung des Amyloid-Vorläufer-Protein negativ beeinflusst und damit die Konzentration an reifem APP verringert. Durch die Erhöhung der Medikamentenkonzentration ließ sich der Effekt jedoch nicht wesentlich steigern.

Abbildung 25 stellt den Quotienten von unreifem APP (110kDa) zu  $\beta$ -Aktin (42kDa) in einem Balkendiagramm dar, welches Aussagen über das unreife APP möglich macht. Unter der Behandlung mit Scriptaid sank der Quotient vom Kontrollwert  $0,8156 \pm 0,03355$ , welcher 100 Prozent entspricht, über  $0,7306 \pm 0,02191$  (= 89,58 Prozent) nach 5  $\mu\text{M}$  auf  $0,4686 \pm 0,01828$  (= 57,45 Prozent) nach 10  $\mu\text{M}$  Scriptaid. Zwischen Kontrolle und 5  $\mu\text{M}$  Scriptaid war die Konzentration des unreifen APP nicht signifikant verändert. 10  $\mu\text{M}$  Scriptaid inhibierten hingegen das unreife APP signifikant.

---

## 4 Diskussion

---

In der vorliegenden Dissertation wurde der Einfluss der HDAC-Inhibitoren Apicidin, Scriptaid, Sirtinol und APHA-Compound 8 auf eine Auswahl von malignen Tumoren untersucht. In der folgenden Diskussion werden zunächst die Ergebnisse der durchgeführten Experimente diskutiert. Des Weiteren wird der Zusammenhang zwischen dem Amyloid-Vorläufer-Protein, Tumorphiliferation im Allgemeinen und der Alzheimer-Erkrankung erläutert. Abschließend folgt ein Ausblick auf die mögliche Zukunft von Histon-Deacetylase-Inhibitoren in der Therapie maligner Erkrankungen.

In den Experimenten der vorliegenden Arbeit wurden die von Venkataramani et al. bereits in vergleichbaren Studien verwendeten gastrointestinalen Kolon- und Pankreaskarzinomzelllinien Sw480 und BxPc3 verwendet (Venkataramani et al. 2010). Das kolorektale Karzinom stellt einen der häufigsten Tumore des Menschen und zugleich das zweithäufigste Karzinom auf der Mortalitätsskala in Europa dar (Jemal et al. 2005). Nach WHO-Klassifikation werden 8 verschiedene histologische Typen unterschieden, worunter das Adenokarzinom die häufigste Form darstellt. Bei der Entstehung der Tumoren spielen insbesondere das Onkogen K-RAS sowie die Tumorsuppressorgene p53 und APC (*adenoma polyposis coli*) eine entscheidende Rolle. Nach der „Two-Hit“-Hypothese von Knudson kann es bei hereditären Karzinomen zur Tumorentstehung kommen, indem auf eine Keimbahnmutation eine somatische Mutation folgt (Knudson 1971).

Das Pankreaskarzinom stellt die 5-häufigste malignombedingte Todesursache in der westlichen Welt dar (Murr et al. 1994). Am häufigsten ist dabei die die histologische Unterform des duktales Adenokarzinoms (Chowdhury und Rayford 2000). Die Entstehung des Pankreaskarzinoms ist nicht vollständig geklärt. Bekannt ist jedoch, dass die Aktivierung des Onkogens K-RAS sowie die funktionelle Inaktivierung von Tumorsuppressorgen ebenfalls eine entscheidende Rolle einnehmen (Hahn und Schmiegel 1998).

Neben diesen Veränderungen wie Aktivierungen von Onkogenen sowie Inaktivierungen von Tumorsuppressorgen wirken insbesondere Wachstumsfaktoren modulierend auf das Tumorwachstum sowie die Angiogenese beider Karzinome. Wachstumsfaktoren wie NGF (*nerve growth factor*), bFGF (*basic fibroblast growth factor*), TGF- $\alpha$  (*transforming growth factor alpha*) sowie EGF (*epidermal growth factor*) können die Bildung von sAPP $\alpha$  über eine Aktivierung der  $\alpha$ -Sekretase verstärken (Mobley et al. 1988; Gray und Patel 1993; Rossner et

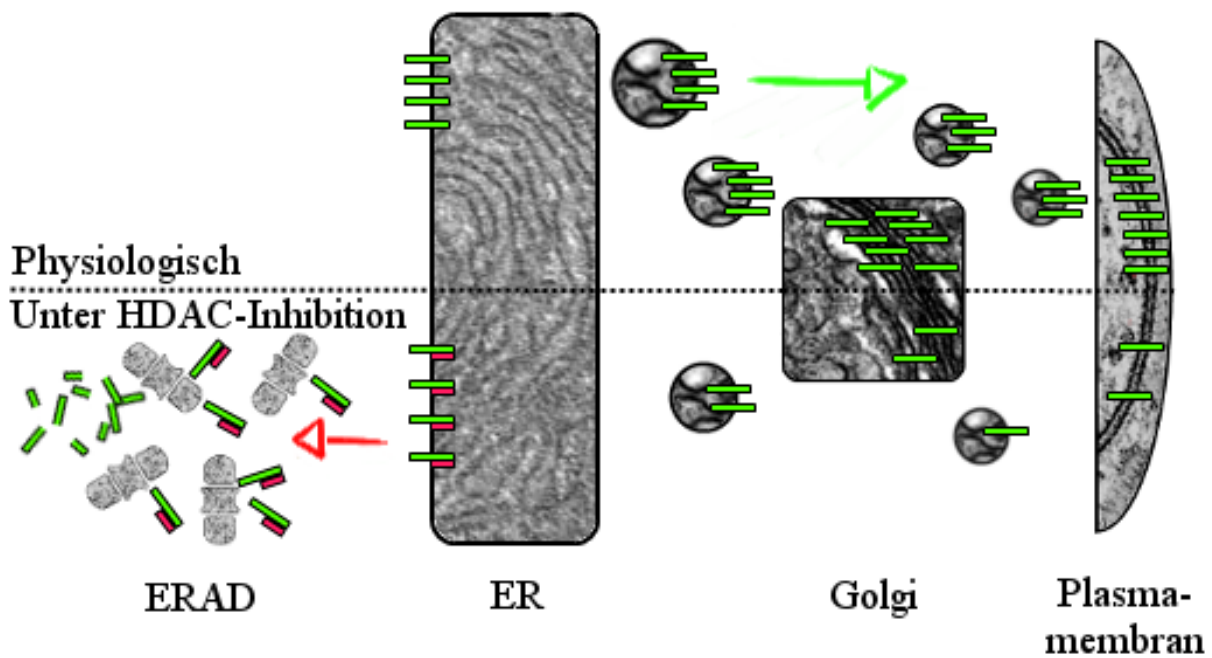
al. 1998). Diese Untersuchungsergebnisse bestätigen das erste Axiom der „*Hallmarks of Cancer*“, wonach Tumorzellen unter anderem die Eigenschaft besitzen, sich selber mit Wachstumsfaktoren wie in diesem Beispiel mit sAPP $\alpha$  zu versorgen (Hanahan und Weinberg 2000).

Vorangegangene Studien konnten in vielen Tumoren, wie dem Schilddrüsen- (Krause et al. 2008), dem Nebenschilddrüsen- (Haven et al. 2004), dem Prostata- (Takayama et al. 2009) und dem oralem Plattenepithelkarzinom (Ko et al. 2004) sowie dem Melanom (Botelho et al. 2010) eine selektive APP-Überexprimierung nachweisen. Folglich nimmt diese eine wichtige Rolle in der Pathogenese von malignen Tumoren ein.

Die übermäßige Expressierung von APP in Tumoren steigert jedoch nicht nur deren Proliferation, sondern hat darüber hinaus auch einen deutlichen Einfluss auf das Überleben der Patienten: Die Überlebenswahrscheinlichkeit bei APP-positiven Tumoren ist signifikant schlechter als bei APP-negativen Tumoren (Takayama et al. 2009; Ko et al. 2004).

Den direkten Zusammenhang zwischen APP-Expressierung und Proliferation von Tumorzellen zugrunde legend könnte APP ein neues potenzielles Angriffsziel in der Therapie maligner Erkrankungen werden. Mit der Senkung der Konzentration von APP in Tumorzellen wäre nicht nur mit einer Proliferationshemmung, sondern auch mit einer Erhöhung der Überlebenswahrscheinlichkeit von Patienten zu rechnen. Die schlechte Prognose der APP-positiven Tumore könnte somit verbessert werden. Tumorpatienten mit APP-positiven Tumorentitäten könnten von Medikamenten, welche die APP-Expressierung supprimieren, deutlich profitieren.

Valproat, ein HDAC-Inhibitor und ein seit langem etablierter Wirkstoff zur Stimmungsstabilisierung und der Behandlung von Epilepsie, senkte in den von Venkataramani et al. 2010 durchgeführten Experimenten die Konzentration von APP und sAPP $\alpha$  (Venkataramani et al. 2010). Damit einhergehend konnte die zelluläre Proliferation der Karzinomzelllinien BxPc3 und Sw480 gesenkt werden. Die Ergebnisse zeigten, dass Valproat die Reifung von APP inhibiert, indem es das Chaperon GRP78 induziert (Baumeister et al. 2009). Dieses vermag, APP innerhalb der Zelle zu binden (Yang et al. 1998), wodurch der wachstumsfördernde APP-/sAPP $\alpha$ -Spiegel sinkt. Im Folgenden nimmt die Proliferation der Zellreihen BxPc3 und Sw480 signifikant ab (Venkataramani et al. 2010). Die folgende Abbildung 26 zeigt schematisch den molekularen Mechanismus der physiologischen APP-Bildung und dessen Inhibition durch HDAC-Inhibitoren.



**Abbildung 26:** Schematische Darstellung des molekularen Mechanismus der physiologischen APP-Bildung und der Inhibition durch HDAC-Inhibitoren

Unter physiologischen Bedingungen wird APP am Endoplasmatischen Retikulum (ER) gebildet und N-glykosyliert. Im Golgi-Apparat (Golgi) folgt der Abschluss der Reifung durch O-Glykosylierung und Tyrosylsulfatierung. Danach wird das reife APP zur Plasmamembran transportiert.

Nach Behandlung mit HDAC-Inhibitoren wird vermehrt GRP78/BiP gebildet. Durch dieses Chaperon wird die unreife APP-Form dem proteosomalen Abbau im „*Endoplasmic-reticulum-associated protein degradation*“ (ERAD) zugeführt. Folglich gelangt weniger reifes APP an die Plasmamembran. Die proliferationssteigende Wirkung des Amyloid-Vorläufer-Proteins wird damit vermindert. Das Amyloid-Vorläufer-Protein ist grün, GRP78/BiP rot dargestellt. (Abbildung modifiziert nach: Venkataramani 2011, Seite 126)

Alle Elektronenmikroskop-Bilder wurden von Wikimedia unter Gemeinfreiheit publiziert.)

Zudem konnte in der kürzlich veröffentlichten Arbeit von Venkataramani et al gezeigt werden, dass dieser Mechanismus auch in vivo zu reproduzieren ist. Der HDAC-Inhibitor Apicidin greift effektiv in den APP-Metabolismus ein. In der Folge sinken Tumorwachstum und APP-Proteinkonzentration nach der Behandlung mit dem HDAC-Inhibitor in vivo (Venkataramani et al. 2012). Die Ergebnisse von Venkataramani et al. zeigen also, dass der HDAC-Inhibitor Valproat über einen posttranslationalen Mechanismus spezifisch in den APP-Metabolismus eingreift. In der vorliegenden Arbeit diente Valproat als schon etabliertes Medikament zum Vergleich zu den neu getesteten HDAC-Inhibitoren.

In der vorliegenden Arbeit sollte das von Venkataramani et al. identifizierte Wirkprinzip der APP-Inhibierung verifiziert und potenziell wirksamere HDAC-Inhibitoren identifiziert werden. Zu diesem Zweck wurden vier verschiedene HDAC-Inhibitoren (Apicidin, Scriptaid, Sirtinol und APHA-Compound 8) untersucht. Zum einen sollte evaluiert werden, ob diese

HDAC-Inhibitoren auf die Reifung von APP Einfluss nehmen können. Zum anderen sollte für den Fall ihrer Wirkung geklärt werden, ob dieser Effekt ebenso auf der Histon-H4-Hyperacetylierung und GRP78-Überexprimierung beruht.

#### 4.1 Die HDAC-Inhibitoren inhibieren die Proliferation

Um die antiproliferative Wirkung und das Wirkspektrum der HDAC-Inhibitoren Apicidin, Scriptaid, Sirtinol und APHA-Compound 8 auf die Karzinomzelllinien zu untersuchen, wurde zunächst ein Proliferationsassay durchgeführt. Die verwendeten Zellreihen Sw480 und BxPc3 wurden mit verschiedenen Konzentrationen der Histon-Deacetylase-Inhibitoren behandelt. In der Auswertung der Ergebnisse zeigte sich Apicidin als eines der wirkstärksten Medikamente. In vorangegangenen Studien konnte für Apicidin ein proapoptotischer oder wachstumshemmender Einfluss auf promyelotischen Leukämiezellen (Cheong et al. 2003; Kwon et al. 2002) Mamma-, Zervix- und Magenkarzinomzellen sowie Zellen des Plattenepithelkarzinoms des Mundes gezeigt werden (Han et al. 2000; Andrews et al. 2000; Ueda et al. 2007; Im et al. 2008; Ahn et al. 2011; Ahn et al. 2010).

Apicidin inhibierte die Proliferation sowohl von Sw480 als auch von BxPc3 bereits in niedrigen Konzentrationen signifikant. Jedoch zeigte die Zellreihe Sw480 in der Proliferationsinhibierung bei einer Apicidinkonzentration zwischen 1  $\mu\text{M}$  und 10  $\mu\text{M}$  keinen wesentlichen Anstieg mehr. Eine Erklärung dafür könnte sein, dass das Wirkspektrum von Apicidin im hohen nanomolaren Bereich liegt (Gallo et al. 2008; Han et al. 2000). Die maximale Proliferationsinhibierung könnte bei 1  $\mu\text{M}$  schon erreicht und daher nicht durch höhere Konzentrationen steigerbar sein.

Für die Zellreihe BxPc3 zeigte Apicidin dagegen eine gute, konzentrationsabhängige Proliferationsinhibierung über alle Konzentrationsstufen hinweg.

Scriptaid wirkte in einem ähnlich niedrigen Konzentrationsbereich wie Apicidin. In vorangegangenen Studien induzierte Scriptaid Wachstumsinhibition, Zellzyklusarrest und Apoptose in Endometrium- und Ovarkarzinomen (Takai et al. 2006) sowie Zellzyklusarrest in Kolonkarzinomzellen (Lee et al. 2008). Des Weiteren vermochte es Apoptose in Gliomzellen auszulösen (Sharma et al. 2010), die Expression des funktionalen Östrogenrezeptor- $\alpha$  in Östrogenrezeptor negativen Brustkarzinomzelllinien zu steigern (Keen et al. 2003), das Wachstum von *Toxoplasma gondii* – dem Erreger der Toxoplasmose – zu hemmen (Strobl et al. 2007) sowie die Sensitivität von menschlichen Kopf-Hals-Karzinomzelllinien auf Bestrahlung (Kuribayashi et al. 2010) zu erhöhen.

In der vorliegenden Arbeit inhibierte Scriptaid sowohl Sw480 als auch BxPc3 konzentrationsabhängig. Im Vergleich zu Apicidin zeigte sich, dass Scriptaid bei einer

Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  sowohl auf Sw480 als auch auf BxPc3 stärker proliferationsinhibierend wirkte. Somit war Scriptaid in Bezug auf die Proliferationsinhibierung das wirkstärkere Medikament.

Sirtinol und APHA-Compound 8 wirkten dagegen im Unterschied zu Apicidin und Scriptaid grundsätzlich erst bei höheren Konzentrationen proliferationshemmend. Sirtinol zeigte in Voruntersuchungen, dass es eine dosisabhängige Reduktion der Zellviabilität von Cervixkarzinomzellen auslöst (Jin et al. 2010) und einen Wachstumsarrest in humanen Mammakarzinomzellen sowie humanen Lungenkarzinomzellen induziert (Ota et al. 2005). Darüber hinaus reduzierte Sirtinol Entzündungen in humanen dermalen Endothelzellen (Orecchia et al. 2011). Daneben kann die Inhibierung von SIRT1 über Sirtinol auch einen Neuronen-protektiven Effekt ausüben (Li et al. 2008). Jedoch stieg unter Einsatz von Sirtinol auch das Risiko für arterielle Thrombosen und die Thromboplastinexprimierung an (Breitenstein et al. 2011).

Sirtinol inhibierte in den durchgeführten Experimenten die Proliferation von Sw480 erst bei einer Konzentration von 30  $\mu\text{M}$  signifikant. Zudem muss bedacht werden, dass bei dieser hohen Konzentration die DMSO-Konzentration ebenfalls sehr hoch (> 2,5 Prozent) war, sodass der Effekt auch durch den zelltoxischen Effekt von DMSO bedingt sein könnte. Die proliferationsinhibierende Wirkung kann damit nicht ausschließlich auf die Wirkung von Sirtinol als HDAC-Inhibitor zurückgeführt werden. Ein Grund für diese mangelnde Proliferationsinhibierung könnte eine potenziell spezifische Resistenz der Zellreihe Sw480 auf den Histon-Deacetylase-Inhibitor Sirtinol sein. Grundsätzlich können für ein schlechtes Ansprechen von Tumorzellen auf die medikamentöse Behandlung mit HDAC-Inhibitoren verschiedene Ursachen in Betracht gezogen werden. Auf zellulärer Ebene könnten die Wirkstoffe durch ATP-abhängige Pumpen entfernt werden. Zudem wäre es möglich, dass die Angriffsziele der Medikamente überexprimiert oder desensitiviert vorliegen. Darüber hinaus könnten epigenetische, antiapoptotische oder überlebensverlängernde Mechanismen das Ansprechen auf HDAC-Inhibitoren verändert haben (Fantin und Richon 2007).

Auf die Zellreihe BxPc3 wirkte Sirtinol dahingegen schon ab 10  $\mu\text{M}$  signifikant proliferationsinhibierend und zeigte mit steigender Konzentration eine konzentrationsabhängige Proliferationsinhibierung.

APHA-Compound 8 zeigte in Voruntersuchungen einen Einfluss auf die Proliferation der Maus-Lymphomzellreihe A20 (Mai et al. 2003). Dazu konnte APHA-Compound 8 die Zytotoxizität und antitumorale Wirkung eines onkolytischen Herpes-simplex-Virus in menschlichen Gliomzellen steigern (Otsuki et al. 2008).



Die Behandlung sowohl von Sw480 als auch von BxPc3 mit dem HDAC-Inhibitor APHA-Compound 8 führte zu einer signifikanten und konzentrationsabhängigen Proliferationsinhibierung. Werden die Ergebnisse der Proliferationsassay-Analysen zusammengefasst, liegen die Wirkspektren der *APHA-Compounds* im mikromolaren Bereich. Somit belegen die vorliegenden Ergebnisse meine erste Arbeitshypothese. Das Zellwachstum der Tumorzellen wird durch die HDAC-Inhibitoren inhibiert. Die Ergebnisse sind ebenso konsistent mit vorangegangenen Studien (Mai et al. 2003).

#### 4.2 Apicidin senkt die APP-Konzentration

Nachdem der Einfluss der Histon-Deacetylase-Inhibitoren auf die Tumorzellproliferation gezeigt werden konnte und zwei potente Histon-Deacetylase-Inhibitoren identifiziert wurden, sollte anschließend auf Zellebene der Einfluss von Apicidin auf APP untersucht werden. Bisherige Studien konnten zeigen, dass ein Teil des proliferationsinhibierenden Effekts von HDAC-Inhibitoren über die Hemmung der APP-Reifung hervorgerufen wird (Venkataramani et al. 2010). Die funktionelle Beziehung zwischen Proliferations- und APP-Inhibierung konnten zudem auch andere Arbeitsgruppen durch *loss-of-function*-Experimente nachweisen (Pietrzik et al. 1998; Hansel et al. 2003; Takayama et al. 2009; Ko et al. 2004). Um den Effekt der HDAC-Inhibitoren auf die APP-Konzentration qualitativ zu zeigen, wurde das Amyloid-Vorläufer-Protein mittels monoklonalem Antikörper (22C11) in der indirekten Immunfluoreszenz sichtbar gemacht. Für das Experiment wurde die Zellreihe Sw480, die aufgrund ihres schnellen sowie zuverlässigen Wachstums ausgewählt wurde, für 24 Stunden mit steigenden Konzentrationen von Apicidin behandelt. Hierbei wurden die beim Proliferationsassay determinierten Konzentrationen verwendet.

In der Immunfluoreszenz zeigte sich eine qualitative, konzentrationsabhängige Abnahme der APP-Konzentration. Dies entspricht den Resultaten vergleichbarer anderer Arbeiten. So konnte zum Beispiel die Abnahme des Amyloid-Vorläufer-Proteins in NTERA-2 Zellen durch immunzytochemische Analysen gezeigt werden. Auch in dieser Arbeit wurden die Zellen mit dem HDAC-Inhibitor Apicidin behandelt (Venkataramani et al. 2012). Die Konzentrationen, unter denen Apicidin APP inhibiert, stimmten mit den Ergebnissen des Proliferationsassays überein. Apicidin inhibierte das Wachstum der Zellen bei 5  $\mu$ M und 10  $\mu$ M Medikamentenlösungen signifikant. So wurde in dieser Arbeit der Zusammenhang zwischen APP-Konzentration und Proliferationsinhibierung unter Behandlung mit Apicidin auf Zellebene sichtbar gemacht. Damit einhergehend wurde meine zweite Arbeitshypothese bestätigt: Die APP-Konzentration sinkt nach Medikamentengabe.

### 4.3 Der molekulare Mechanismus der Inhibierung

Um die bisherigen Resultate molekularbiologisch zu sichern sowie den Einfluss der weiteren drei HDAC-Inhibitoren auf APP zu untersuchen, wurden Western-Blot-Analysen durchgeführt. Mithilfe dieser Methode konnten die APP-Konzentration der Zellen nach ihrer Behandlung mit den Histon-Deacetylase-Inhibitoren genau quantifiziert werden. Zusätzlich sollten weitere beteiligte Proteine, die im Zusammenhang mit der APP-Reifung und der Wirkung der Medikamente auf die Zellen stehen, untersucht werden.

Für die Western-Blot-Analysen wurde erneut die zuverlässige und schnell wachsende Kolonkarzinomzelllinie Sw480 ausgewählt. Für die quantitative Analyse des Einflusses der HDAC-Inhibitoren auf die APP-Konzentration wurde der APP-spezifische W0-2-Antikörper verwendet. Bei Untersuchung von APP in der Western-Blot-Analyse zeigten sich zwei Proteinbanden: eine bei 110 kDa und eine weitere bei 130 kDa. Mittels Pulse-Chase-Experiment konnten diese Banden als reife und unreife Variante des Amyloid-Vorläufer-Proteins identifiziert werden (Venkataramani et al. 2010).

Des Weiteren wurden in der Western-Blot-Analyse die Proteinkonzentrationen von hyperacetyliertem Histon 4, GRP78 sowie von APLP2 (amyloid precursor-like protein 2) überprüft. Histon H4 ist das potenzielle Angriffsziel der HDAC-Inhibitoren, da Histon H4 bei den durch die HDAC-Inhibitoren katalysierten Modifikationen eine wichtige Rolle einnimmt (Dorigo et al. 2003). Zudem korreliert der Hyperacetylierungsgrad dieses Histons direkt mit der Konzentration von GRP78 (Shi et al. 2007). GRP78, ein Hitzeschockprotein (HSP) und Chaperon, das in die APP-Reifung eingreift (Shi et al. 2007). Venkataramani et. al konnten 2010 zeigen, dass GRP78 die APP-Reifung inhibiert und somit die Histon-H4-Hyperacetylierung im Zusammenhang mit der Inhibierung des Amyloid-Vorläufer-Proteins steht (Venkataramani et al. 2010). Zusätzlich wurde APLP2 – als ein Mitglied der APP-Genfamilie, die aus APLP1, APLP2 und APP besteht – untersucht, um den Einfluss der Medikamente auf diese strukturverwandten Proteine auszuschließen.

In den Ergebnissen der Western-Blot-Analyse bestätigten sich die Ergebnisse des Proliferationsassays und der Immunfluoreszenz. Apicidin und Scriptaid zeigten einen starken Einfluss auf die Reifung des Amyloid-Vorläufer-Proteins. Die Proteinkonzentration von hyperacetyliertem Histon 4, dem Angriffsziel der HDAC-Inhibitoren, stieg erwartungsgemäß nach Zugabe der Medikamente an. GRP78 ein Hitzeschockprotein (HSP), welches in die APP-Reifung eingreift (Shi et al. 2007), wurde durch die Hyperacetylierung des Histons H4 überexprimiert. Diese Tatsache belegt, dass die HDAC-Inhibitoren Apicidin und Scriptaid über den von Venkataramani et al. 2010 proklamierten Wirkmechanismus auf die Reifung des

Amyloid-Vorläufer-Proteins Einfluss nehmen. Durch die Hyperacetylierung des Histons H4 stieg die Konzentration des Hitzeschockproteins GRP78 an. Dieses inhibierte wiederum die Reifung des N-glykolisierten Amyloid-Vorläufer-Proteins (Venkataramani et al. 2010; Venkataramani et al. 2012). In der Zusammenschau aller Ergebnisse lässt sich Folgendes festhalten: Apicidin inhibierte das gesamte APP und die Reifung des N-glykolisierten, sprich unreifen APP sowie des O-glykolisierten, sprich reifen APP. Auch Scriptaid senkte das gesamte APP sowie die reife und die unreife Form desselben signifikant. Dagegen blieb die Konzentration von APLP2 konstant. Dies weist auf den spezifischen Effekt der Medikamente auf das Amyloid-Vorläufer-Protein hin.

Diese Daten konnten zeigen, dass Apicidin und Scriptaid das Amyloid-Vorläufer-Protein selektiv inhibieren. Bei Analyse der HDAC-Inhibitoren in Hinsicht auf ihr Inhibitionsspektrum zeigte sich, dass Apicidin und Scriptaid im Vergleich zu Valproat sehr ähnliche Spektren von Histon-Deacetylasen inhibieren (siehe Absatz 1.2.3.3.1 Apicidin; Seite 9). Dies könnte erklären, warum beide Medikamente den gleichen molekularen Mechanismus bei der Inhibierung von APP aufweisen. Die optimale Konzentration von Scriptaid zur HDAC-Inhibition lag in den durchgeführten Experimenten bei durchschnittlich 6 bis 8  $\mu\text{M}$  (Su et al. 2000). Diese im Proliferationsassay ermittelte Konzentration bestätigte sich auch in der Western-Blot-Analyse. Schon ab einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  konnte eine Hyperacetylierung von Histon H4 nachgewiesen werden.

Apicidin zeigte hingegen laut anderer Studien schon im hohen nanomolaren Bereich eine irreversible Hemmung der Klasse-I-HDAC-Enzyme (Gallo et al. 2008; Han et al. 2000). Venkataramani et al. hatten ebenfalls im Jahr 2012 bei der Behandlung von NTera-2-Zellen bereits mit 1  $\mu\text{M}$  Apicidin hyperacetyliertes Histon H4 in der Western-Blot-Analyse nachgewiesen. In den Western-Blot-Analysen der vorliegenden Arbeit konnte das reife APP jedoch erst bei einer Apicidinkonzentration von 5  $\mu\text{M}$  deutlich verringert werden. Unter Erhöhung der Konzentration auf 10  $\mu\text{M}$  konnte die Abnahme weiter verstärkt bzw. das reife APP sogar fast vollständig inhibiert werden.

Diese Ergebnisse zeigen, dass eine nanomolare Konzentration, wie in den vorangegangenen Studien beschrieben, in den von mir getesteten Zellreihen nicht ausreichte, um die Produktion von reifem, wachstumsanregendem APP maximal zu inhibieren. Dennoch zeigte sich im Proliferationsassay, dass bei einer Apicidinkonzentration über 1  $\mu\text{M}$  keine weitere Wachstumsinhibierung stattfand.

Somit konnten auch die letzten beiden gestellten Arbeitshypothesen bestätigt werden. Die Medikamente Apicidin und Scriptaid hyperacetylieren Histon H4 und erhöhen die GRP78-

Produktion. Dadurch inhibieren sie die Reifung des Amyloid-Vorläufer-Proteins. Im Gegensatz zu Apicidin und Scriptaid hatten die Histon-Deacetylase-Inhibitoren Sirtinol und APHA-Compound 8 in niedrigen Dosierungen keinen nennenswerten Einfluss auf die APP-Konzentration. Diese Ergebnisse der Western-Blot-Analysen stehen im Einklang mit den Resultaten der Proliferationsassay-Untersuchungen. Auch hier konnte ein Einfluss der beiden HDAC-Inhibitoren Sirtinol und APHA-Compound 8 auf die APP-Konzentration nicht überzeugend nachgewiesen werden. Dennoch zeigten Studien, dass Medikamente wie Sirtinol, welche die Wirkung von Sirtuinen zu inhibieren vermögen, in der Behandlung von Diabetes, Karzinomen, Artherosklerose und auch der Alzheimer-Erkrankung eingesetzt werden könnten (Taylor et al. 2008). Ein mögliches Angriffsziel bei der Therapie der Alzheimer-Erkrankung stellt dabei SIRT1 dar. Durch eine Steigerung der SIRT1-Aktivität wird der Rezeptor RAR-beta (*retinoic acid receptor beta*) aktiviert. Dieser steigert wiederum die Expression der  $\alpha$ -Sekretase ADAM10 und vermindert damit die  $\beta$ -Amyloidproduktion (Donmez et al. 2010). In den Experimenten dieser Arbeit zeigte Sirtinol erst bei einer im Vergleich zu den bisher getesteten Medikamenten hohen Konzentration von 60  $\mu$ M einen Effekt auf Histon H4 und APP. Auch im Proliferationsassay konnte Sirtinol erst ab einer Konzentration von 30  $\mu$ M eine signifikante Proliferationsinhibierung der Zellreihe Sw480 aufweisen. Die Tatsache, dass das Medikament erst in hoher Konzentration wirkt, könnte zum einen an der verminderten Potenz des Medikaments im Vergleich zu Apicidin und Scriptaid liegen. Des Weiteren muss der Einfluss des Lösungsmittels DMSO auf die Zellen berücksichtigt werden. DMSO inhibiert in hohen Dosen HDAC und könnte die Hyperacetylierung von Histon H4 verursacht haben (Nickels 2004). Sirtinol inhibiert zudem keines der HDACs Klasse I oder II, sondern ausschließlich HDACs III, also Sirtuine. Es zeigt keine Ähnlichkeit zu dem Inhibitionsprofil der anderen getesteten Medikamente (siehe Tabelle 1.2.3.3.1). Dies erklärt zusätzlich den fehlenden oder sehr späten Einfluss von Sirtinol auf Histon H4. Da Sirtinol jedoch auf die Proliferation von BxPc3-Zellen Einfluss nahm, muss das Medikament über weitere bisher nicht untersuchte Zellwege Einfluss genommen haben. Eine Erklärung für die Proliferationsinhibition ist, dass Sirtinol Zelltod und p53-Acetylierung auslöst, indem das Medikament SIRT1 und SIRT2 inhibiert (Peck et al. 2010). Ob der Einfluss von Sirtinol auf APP bei einer sehr hohen Konzentration von 60  $\mu$ M über Inhibierung der HDAC-Klasse III oder allein über die hohe Konzentration an DMSO ausgelöst wurde, kann nicht sicher differenziert werden und sollte in weiteren Experimenten untersucht werden.

APHA-Compound 8 zeigte ein dem HDAC-Inhibitor Apicidin sehr ähnliches Inhibitionsprofil

(vergleiche Tabelle 1, Absatz 1.2.3.3.1 Apicidin; Seite 9). Demnach wäre ein ähnlicher Effekt von APHA-Compound 8 auf die Proliferation sowie auf die APP-Konzentration der Sw480-Zellen zu erwarten gewesen. In den Proliferationsassays bestätigte sich diese Erwartung bei höheren Konzentrationen. Die Zellreihe BxPc3 wurde ab 10  $\mu\text{M}$ , der niedrigsten getesteten Dosis signifikant inhibiert. Die Zellreihe Sw480 zeigte nach 15  $\mu\text{M}$  eine signifikante Hemmung. Diese Fähigkeit zur Wachstumsinhibierung konnte auch in anderen Zellen festgestellt werden (Mai et al. 2002; Mai et al. 2003). Dies zeigt, dass APHA-Compound 8 über antiproliferative Eigenschaften verfügt.

Entgegengesetzt der Erwartungen zeigte APHA-Compound 8 in den Western-Blot-Analysen keinen nennenswerten Einfluss auf die APP-Konzentration. Dieses Ergebnis änderte sich auch nach mehrfacher Wiederholung der Experimente nicht, obwohl APHA-Compound 8 ab einer Konzentration von 5  $\mu\text{M}$  eine Hyperacetylierung von Histon H4 auslösen konnte. Diese Ergebnisse überraschen umso mehr, da die Histon-H4-Hyperacetylierung in der Literatur als einer der zentralen Mechanismen bei der Überexprimierung von GRP78 gilt (Shi et al. 2007; Venkataramani et al. 2010). Laut der anerkannten Theorien hätte bei der Hyperacetylierung von Histon H4 die Menge an GRP78 zunehmen und in der Folge die Reifung des Amyloid-Vorläufer-Proteins inhibieren müssen. Da die GRP78-Konzentration in den Western-Blot-Analysen nicht untersucht wurde, kann nachträglich keine Aussage über dessen Konzentration und die damit verbundene APP-Inhibierung getroffen werden. In der Zusammenschau dieser Ergebnisse ist ein methodischer Fehler bei der Durchführung der Experimente am wahrscheinlichsten. Dies erscheint insbesondere vor dem Hintergrund wahrscheinlich, dass eine selektive Suppression von HDAC1 ausreichend ist, um eine effektive GRP78-Expression zu induzieren (Baumeister et al. 2009). Eben dieses HDAC1 ist vorangegangenen Studien nach auch unter denen durch APHA-Compound 8 inhibierten HDACs (vgl. Einleitung 1.2.3.3.1). Dass aber APHA-Compound 8 sowohl die Proliferation von Sw480- als auch BxPc3-Zellen signifikant inhibieren kann und auch andere Zellen in der Proliferation inhibiert (Mai et al. 2002; Mai et al. 2003), zeigt, dass APHA-Compound 8 über anti-proliferative Eigenschaften verfügen muss. Wahrscheinlich vermag APHA-Compound 8 weitere epigenetische Zellwege zu modifizieren, die zu Zellzyklus-Arrest und Apoptose führen (Vigushin und Coombes 2004). Auch Apicidin zeigte in niedrigen Konzentrationen zwar Einfluss auf die Proliferation der Zellreihen, jedoch keinen in der Western-Blot-Untersuchung zu detektierenden Einfluss auf die APP-Konzentration.

Dieses Ergebnis führt zu der Annahme, dass HDAC-Inhibitoren nicht nur Einfluss auf APP nehmen, sondern über diverse molekulare Mechanismen Zelltod und Wachstumsinhibierung

auslösen können. Studien konnten zeigen, dass unter dem Einsatz von HDAC-Inhibitoren, die über ihren Einfluss auf die Histon-Deacetylase wirken, etwa 3 bis 10 Prozent aller Gene moduliert wurden (Van Lint et al. 1996; Glaser et al. 2003). Die Folge waren die Steigerung der Apoptoseraten sowie die Auslösung einer Wachstumsinhibierung (Müller und Krämer 2010). Die extrinsische Apoptose, also durch Bindung eines Liganden an einen „Todesrezeptor“ (TNF-Rezeptorfamilie) ausgelöst, wird durch Erhöhung der Expression von Fas, TNF- $\alpha$  (Rosato et al. 2003b) oder auch TRAIL und DR5 (Johnstone 2002) initiiert. Die intrinsische Apoptose wird dagegen über pro- und antiapoptotische Proteine reguliert. HDAC-Inhibitoren vermögen dieses Gleichgewicht zu deregulieren (Minucci und Pelicci 2006), indem sie z. B. Bmf und Bim aktivieren oder Bcl-2 und Bcl-XL deaktivieren (Rosato et al. 2003b; Ruefli et al. 2001). Dies führt in der Folge zur Steigerung der Apoptoserate der Tumorzellen. Die intrinsische Apoptose kann zudem auch durch die Steigerung der ROS-Exprimierung (Sade und Sarin 2004) und der daraus resultierenden Erhöhung intrazellulärer reaktiver Sauerstoffradikale (Rosato et al. 2003a) aktiviert werden.

Des Weiteren haben HDAC-Inhibitoren einen Einfluss auf das Überleben und die Versorgung von Tumorzellen über die Hemmung der Angiogenese (Marks 2010) mittels Inhibierung des Wachstumsfaktors VEGF (*vascular endothelial growth factor*) (Deroanne et al. 2002) und HIF1 $\alpha$  (*Hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$* ) (Qian et al. 2006). Die Kinase p21, auch CDK-Inhibitor 1 genannt, die wesentlich für die Kontrolle des Zellzyklus verantwortlich ist, wird durch HDAC-Inhibitoren hochreguliert. Dies führt zu Inhibierung des Cyclin-/CDK-Komplexes, wodurch Zellzyklusarrest und Inhibierung der Zelldifferenzierung ausgelöst werden (Richon et al. 2000; Sandor et al. 2000).

Ein weiteres Beispiel der Beeinflussung von Tumorzellen durch HDAC-Inhibitoren ist der Einfluss auf das Ubiquitin-Proteasom-System und das „*misfolded protein response*“ (MPR). Das Chaperon HSP90, welches mit Karzinomen assoziierte Proteine wie Akt, Bcr-Abl, c-Raf und ErbB2 vor dem Abbau zu schützen vermag (Calderwood et al. 2006), wird durch HDAC6 acetyliert. Die Hemmung von HDAC6 über HDAC-Inhibitoren führt zu einer Hyperacetylierung von HSP90. Hierunter wird die Funktion des Proteins eingeschränkt und in der Folge die wachstumsfördernden Proteine Akt, Bcr-Abl, c-Raf and ErbB2 vermehrt abgebaut (Bali et al. 2005; Khan und Thangue 2012).

Vor dem Hintergrund dieser Ergebnisse wird deutlich, dass Histon-Deacetylase-Inhibitoren nicht allein durch die Inhibierung der APP-Reifung Tumorphiliferation hemmen können. Die in der vorliegenden Arbeit beobachtete Proliferationsinhibierung durch APHA-Compound 8, welche nicht mit Senkung der APP-Konzentration in Verbindung gebracht werden konnte,

könnte somit auch durch nicht untersuchte proapoptotische Mechanismen ausgelöst worden sein. Auch die Proliferationsinhibierung von Apicidin in niedrigen Konzentrationen, welche nicht mit einer APP-Inhibierung in der Western-Blot-Analyse einherging, könnte durch diese molekularen Mechanismen ausgelöst worden sein.

#### 4.4 Die Alzheimer-Erkrankung und Krebs

So unterschiedlich die Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung und der von Karzinomen auch sein mag – sie haben etwas gemeinsam: das Amyloid-Vorläufer-Protein.

Erstmals konnte Roe et al. in einer im Jahr 2010 veröffentlichten epidemiologischen Studie zeigen, dass ein wechselseitiger Zusammenhang zwischen Karzinomen und der Alzheimer-Erkrankung besteht. Patienten mit der Diagnose Alzheimer haben eine um 69 Prozent geringere Wahrscheinlichkeit, eine Krebserkrankung zu bekommen als Patienten ohne die Demenzerkrankung. Im Umkehrschluss haben auch Patienten mit einem Karzinom als Grunderkrankung ein um ca. 43 Prozent geringeres Risiko die Alzheimer-Erkrankung zu entwickeln (Roe et al. 2010). Das Amyloid-Vorläufer-Protein spielt in der Pathogenese beider Erkrankungen eine wichtige Rolle. Aus APP entsteht durch Spaltung das Amyloid- $\beta$ -Protein (A $\beta$ ). Durch Akkumulation von A $\beta$  kommt es bei der Alzheimer-Erkrankung zur Bildung der pathophysiologisch relevanten toxischen Plaques (Hashimoto et al. 2003).

Erst in der letzten Forschungsgeschichte konnte eine weitere Eigenschaft des Amyloid-Vorläufer-Proteins identifiziert werden: APP und sAPP $\alpha$  (*secreted amyloid precursor protein alpha*), welches als Produkt aus dem Amyloid-Vorläufer-Protein nach extrazellulärer Spaltung durch das Enzym  $\alpha$ -Sekretase entsteht, erfüllen die Kriterien eines Wachstumsfaktors und unterstützen somit die Proliferation von APP-produzierenden Tumoren (Saitoh et al. 1989; Hoffmann et al. 2000; Caillé et al. 2004; Venkataramani et al. 2010).

Der epidemiologische Zusammenhang zwischen den Erkrankungen (Roe et al. 2010; Roe et al. 2005) lässt sich dabei aber nicht ausschließlich auf APP zurückführen.

Pin1, welches in der Kontrolle der Apoptose, des Zellzyklus und des Proteinfaltens eine Rolle spielt (Driver und Lu 2010), ist in vielen Tumoren überexprimiert (Bao et al. 2004). In Gehirnen von Alzheimer-Erkrankten konnten dagegen erniedrigte Konzentrationen nachgewiesen werden (Liou et al. 2003; Lu et al. 1999; Sultana et al. 2006). Studien konnten zudem zeigen, dass sich das Tumorwachstum verringert, wenn Pin1 in Tumoren inhibiert wird (Uchida et al. 2003), da Pin1 für die Zellteilung benötigt wird (Wulf et al. 2004).

Dagegen zeigt sich in Gehirnen von an Alzheimer erkrankten Mäusen, dass die Überexprimierung von Pin1 die neurodegenerativen Pathologien vermindern kann (Lim et al.

2008). Somit kann Pin1 als Bindeglied zwischen Karzinomen und der Alzheimer-Erkrankung den epidemiologischen Zusammenhang erklären: Wenn die Pin1-Expriemierung durch Mutationen vollständig inhibiert wird, geht dies mit einem erhöhten Risiko einher, die Alzheimer-Erkrankung zu entwickeln (Segat et al. 2007). Das Risiko an einem Karzinom zu erkranken, nimmt dagegen signifikant ab (Lu et al. 2009). Desweiteren ist p53, ein Tumorsuppressorgen, ein weiteres molekulares Bindeglied in der Pathogenese zwischen Alzheimer und Karzinomen. In diesem bestehen Polymorphismen, welche den Betroffenen vor Krebs schützen. Im Gegenzug erhöhen sie jedoch das Risiko für eine neurodegenerative Erkrankung wie Alzheimer (Van Heemst et al. 2005). Diese Übersicht zeigt, dass neben APP Pin1 und p53 die epidemiologische Verbindung zwischen der Alzheimer-Erkrankung und Karzinomen erklären kann.

Wissenschaftliche Arbeiten der letzten Jahre konnten zeigen, dass Histon-Deacetylase-Inhibitoren nicht nur als Therapeutika in der Krebstherapie Verwendung finden, sondern auch ein Potenzial in der Behandlung von neurologischen Erkrankungen haben könnten (Kazantsev und Thompson 2008). HDAC-Inhibitoren können p53 stabilisieren und dadurch den Zellzyklusarrest auslösen (Xu 2003). Ihr Einfluss auf p53 könnte auch den schon beschriebenen positiven Einfluss auf neurodegenerative Erkrankungen verstärken. Im Jahr 2010 konnte gezeigt werden, dass der neue HDAC-Inhibitor Vorinostat sowie bewährte HDAC-Inhibitoren wie Valproat und Natriumbutyrat das kontextabhängige Erinnerungsvermögen von an Alzheimer erkrankten, transgenetisch veränderten Mäusen verbessern (Kilgore et al. 2010). Der HDAC-Inhibitor 4B konnte die Symptome von an Chorea Huntington erkrankten, transgenetisch veränderten Mäusen verbessern (Thomas et al. 2008). Der Einfluss auf gemeinsame Nenner wie APP oder auch p53 sollte in zukünftigen Studien genauer untersucht werden, um eine verbesserte Therapie neurodegenerativer sowie Tumorerkrankungen möglich zu machen.

#### **4.5 Aussicht**

In der Zusammenschau der Ergebnisse bieten sich vielversprechende Einsatzmöglichkeiten von HDAC-Inhibitoren sowohl in der zukünftigen Therapie von Tumorerkrankungen als auch von neurodegenerativen Erkrankungen wie Morbus Alzheimer und Chorea Huntington. Neben dem bisher bekannten Einfluss des HDAC-Inhibitors Valproat auf die Proliferation der Zellreihen Sw480 und BxPc3 konnte in dieser Dissertation ein signifikanter und konzentrationsabhängiger Einfluss der HDAC-Inhibitoren Apicidin, Scriptaid, Sirtinol und APHA-Compound 8 auf das Wachstum dieser Zellreihen gezeigt werden. Die getesteten Medikamente wirkten dabei im Vergleich mit Valproat ohne Ausnahme in geringeren



Konzentrationen auf Sw480 und BxPc3. Aktuelle Ergebnisse haben zudem gezeigt, dass Apicidin das Amyloid-Vorläufer-Protein auch *in vivo* signifikant senkt (Venkataramani et al. 2012).

Mit der Inhibierung von APP könnte eine Proliferationshemmung von Tumoren erreicht und demzufolge die Überlebenswahrscheinlichkeit von Patienten erhöht werden.

Zukünftige Studien sollten neben Valproat auch weitere bekannte Medikamente, die gleichzeitig HDAC-Inhibitoren sind, auf ihren antiproliferativen Effekt in APP positiven Tumoren untersuchen. Als erfolgsversprechend könnten sich hier unter anderem die Antiepileptika Carbamazepin oder Levetiracetam herausstellen (Eyal et al. 2004; Beutler et al. 2005).

Zusätzlich zeigen HDAC-Inhibitoren neben ihrem Effekt auf die Tumorzellen nur einen geringen Effekt auf Nicht-Tumorzellen. Gesunde Zellen sind dadurch bei der systemischen Behandlung durch HDAC-Inhibitoren unempfindlicher (Qiu et al. 2000). Dennoch können auch schwerere Nebenwirkungen wie Thrombozytopenien auftreten (Marks und Xu 2009). APP könnte in der Zukunft auch als prognostischer Biomarker verwendet werden (Venkataramani et al. 2010; Takayama et al. 2009; Ko et al. 2004).

Das prognostische Gewicht des Amyloid-Vorläufer-Proteins könnte durch die Untersuchung mehrerer mit einem Karzinom erkrankter Patienten identifiziert werden. Dafür müsste die APP-Expriemierung der Tumoren mittels immunhistochemischer Färbungen untersucht und der Therapieerfolg der jeweiligen Patienten nach Behandlung analysiert werden. Um ein besseres Verständnis über den Einfluss der HDAC-Inhibitoren auf die Zellen zu gewinnen, sollten ebenso weitere Experimente zur Charakterisierung der genauen Signaltransduktionswege durchgeführt werden. Hierdurch könnte die biologische Funktion des APP aufgeklärt sowie neue Erkenntnisse über die Wechselwirkung von APP und APP-Spaltprodukten wie sAPP $\alpha$  und A $\beta$  mit anderen Proteinen und Enzymen auf molekularer Ebene gewonnen werden.

Diese Arbeit zeigt, dass HDAC-Inhibitoren in der Tumorthherapie als erfolgsversprechende neue Therapie eingesetzt werden können. Dabei kann bisher nicht auf die in dieser Arbeit verwendeten Medikamente zurückgegriffen werden, da diese noch nicht in klinische Studien eingeschlossen waren. Daher sollten für die weitere Forschung auf bereits in klinischen Studien befindliche oder schon für die Therapie zugelassene HDAC-Inhibitoren zurückgegriffen werden. So wurden bereits die HDAC-Inhibitoren Vorinostat im Jahr 2006 und Romidepsin im Jahr 2009 für die Behandlung des kutanen T-Zell-Lymphoms zugelassen (Kim und Bae 2011). Diese könnten in Hinblick auf ihren Einfluss auf APP *in vivo* untersucht

werden. HDAC-Inhibitoren können auch bei weiteren Erkrankungen eine Behandlungsmöglichkeit darstellen. Zu diesen zählen insbesondere chronisch inflammatorische Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen, da HDAC-Inhibitoren bereits in niedrigen Dosierungen einen antiinflammatorischen Effekt aufweisen (Dinarello et al. 2011). So könnten HDAC-Inhibitoren zu einem wichtigen Pfeiler in der zukünftigen Behandlung von Tumoren, neurodegenerativen Erkrankungen und Autoimmunerkrankungen werden.

## 5 Zusammenfassung

---

Das Amyloid-Vorläufer-Protein (APP) ist ein integrales Membranprotein, welches in neuronalen und nicht neuronalen Geweben des Menschen exprimiert wird. Neben seiner bekannten Relevanz in der Pathogenese der Alzheimer-Erkrankung nimmt es eine weitere physiologische Rolle ein: APP ist ein Wachstumsfaktor.

Diese Funktion machen sich auch Karzinomzellen zunutze. APP wird in Kolon-, Pankreas- und weiteren Karzinomzelllinien überexprimiert. Durch den HDAC-Inhibitor Valproat kann die Proliferation von Tumorzellen verringert werden. Dabei führt die Behandlung der Zellen mit Valproat zu einer Hyperacetylierung des Histons H4 und damit verbunden auch zu einer erhöhten Konzentration des Chaperon GRP78. Dieses hemmt die APP-Reifung, indem es das unreife APP bindet. Die intrazelluläre APP-Konzentration sinkt und die extrazellulären wachstumsfördernden Spaltprodukte wie sAPP $\alpha$  werden vermindert sezerniert. In der Folge wird die Proliferation der Tumorzellen signifikant inhibiert. Die Identifikation neuer und potenter HDAC-Inhibitoren hat eine große Relevanz, um neue Therapiestrategien in der Krebstherapie zu ermöglichen und die Überlebenschancen von Tumorpatienten zu verbessern. In der vorliegenden Arbeit wurde die Wirkung der Histon-Deacetylase-Inhibitoren Apicidin, Scriptaid, Sirtinol sowie APHA-Compound 8 auf die Tumorzelllinien Sw480 (Kolonkarzinom) und BxPc3 (Pankreaskarzinom) getestet.

In der vorliegenden Arbeit konnte erstmals gezeigt werden, dass alle vier getesteten HDAC-Inhibitoren die Proliferation der untersuchten Tumorzellen hemmen. Die getesteten Medikamente wirkten dabei ohne Ausnahme in geringeren Konzentrationen auf Sw480 und BxPc3 als Valproat. Apicidin, Scriptaid und Sirtinol inhibierten zudem die Reifung von APP. In der Western-Blot-Analyse zeigte sich, dass die Konzentration des Amyloid-Vorläufer-Proteins nach Zugabe der Medikamente sank. Die Immunfluoreszenz bestätigte, dass Apicidin die APP-Konzentration in Sw480-Zellen konzentrationsabhängig vermindert. Dieses Ergebnis stützt die These, dass der Wachstumsfaktor APP auch durch die getesteten HDAC-Inhibitoren gehemmt wird. Zudem konnte in der Western-Blot-Analyse der molekulare Mechanismus der Medikamente, welcher mit dem von Valproat identisch ist, verifiziert werden. Histon H4 zeigte sich erwartungsgemäß hyperacetyliert, GRP78 wurde hochreguliert und APLP2 als APP-homologes Protein blieb unverändert. Eine Ausnahme stellt der HDAC-Inhibitor APHA-Compound 8 dar. Dieser inhibierte zwar die Proliferation der Zellen und in der Western-Blot-Analyse konnte eine starke Hyperacetylierung von Histon H4 dargestellt werden. Dennoch

konnte in der Western-Blot-Analyse weder eine Inhibition des reifen noch des unreifen APP nachgewiesen werden.

Zusammenfassend zeigte sich, dass Apicidin und Scriptaid das Amyloid-Vorläufer-Protein in niedriger Dosierung inhibieren können. Somit könnten die Medikamente in Zukunft in der Therapie von APP-positiven Tumoren und besonders im Fall der getesteten Karzinome neue Behandlungsoptionen bieten und das Spektrum der Behandlung erweitern.

## 6 Anhang

### 6.1 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Der Effekt von DMSO auf das Wachstum von Sw480 .....	35
Abbildung 2: Der Effekt von Apicidin auf das Wachstum von Sw480 .....	36
Abbildung 3: Der Effekt von Scriptaid auf das Wachstum von Sw480.....	37
Abbildung 4: Der Effekt von Sirtinol auf das Wachstum von Sw480 .....	39
Abbildung 5: Der Effekt von APHA-Compound 8 auf das Wachstum von Sw480 .....	40
Abbildung 6: Der Effekt von Apicidin auf das Wachstum von BxPc3 .....	42
Abbildung 7: Der Effekt von Scriptaid auf das Wachstum von BxPc3 .....	43
Abbildung 8: Der Effekt von Sirtinol auf das Wachstum von BxPc3 .....	45
Abbildung 9: Der Effekt von APHA-Compound 8 auf das Wachstum von BxPc3 .....	46
Abbildung 10: Vergleich der Wirkung von Apicidin und Scriptaid (5 $\mu$ M) auf Sw480 und BxPc3 .....	47
Abbildung 11: Der repräsentative Ausschnitt der Immunfluoreszenzfärbung zeigt das Amyloid-Vorläufer-Protein (grün) in Methanol fixierten Sw480-Kolonkarzinomzellen ohne Medikamentenbehandlung. ....	49
Abbildung 12.1 und 12.2: Immunfluoreszenzbilder ohne Medikamente.....	49
Abbildung 13: Der repräsentative Ausschnitt der Immunfluoreszenzfärbung zeigt das Amyloid-Vorläufer-Protein in Methanol fixierten Sw480-Kolonkarzinomzellen nach 24-stündiger Inkubation mit 5 $\mu$ M Apicidin. ....	50
Abbildung 14.1 und 14.2: Immunfluoreszenzbilder nach Inkubation mit 5 $\mu$ M Apicidin für 24 Stunden.....	50
Abbildung 15: Der repräsentative Ausschnitt zeigt das Amyloid-Vorläufer-Protein in Methanol fixierten Sw480-Kolonkarzinomzellen nach 24-stündiger Inkubation mit 10 $\mu$ M Apicidin.....	51
Abbildung 16.1 und 16.2: Immunfluoreszenzbilder nach Inkubation mit 10 $\mu$ M Apicidin für 24 Stunden Abbildung 16.1 zeigt die DAPI-Färbung der Sw480 Zellen, in der die Zellkerne angefärbt sind. Abbildung 16.2 zeigt das mit dem Antikörper 22C11 (1:100) gefärbte APP der Sw480-Zellen. ....	51

---

Abbildung 17: Von links nach rechts: Vergleichende Darstellung von Abbildung 11, Abbildung 13 und Abbildung 15. Die Abschwächung des grünen Fluoreszenzsignals (APP) bei zunehmender Apicidinkonzentration in der Zelllinie Sw480 stellt die Abnahme der APP-Konzentration dar.....	52
Abbildung 18: Einfluss der HDAC-Inhibitoren Scriptaid und Apicidin auf reifes und unreifes APP, APLP2, GRP78 und H4ac. Als Ladekontrolle diente $\beta$ -Aktin. ....	53
Abbildung 19: Einfluss der HDAC-Inhibitoren Sirtinol und APHA-Compound 8 (in Abbildung als APHA abgekürzt) auf reifes und unreifes APP und H4ac. Als Ladekontrolle diente $\beta$ -Aktin.....	55
Abbildung 20: Darstellung des APP- $\beta$ -Aktin-Quotienten nach densitometrischen Messungen der Gesamt- APP(110-130kDa)- und $\beta$ -Aktin(42kDa)-Bande. ....	57
Abbildung 21: Darstellung des Quotienten von reifem (130kDa) und unreifem (110kDa) APP unter Einfluss steigender Konzentrationen des HDACi Apicidin.....	58
Abbildung 22: Darstellung des Quotienten von unreifem APP (110kDa) zu $\beta$ -Aktin (42kDa) unter Einfluss von steigenden Konzentrationen des HDACi Apicidin. ....	58
Abbildung 23: Darstellung des APP- $\beta$ -Aktin-Quotienten nach densitometrischen Messungen der Gesamt- APP(110-130kDa)- und $\beta$ -Aktin(42kDa)-Bande. ....	59
Abbildung 24: Darstellung des Quotienten von reifem (130kDa) und unreifem (110kDa) APP unter Einfluss von steigenden Konzentrationen des HDACi Scriptaid.....	60
Abbildung 25: Darstellung des Quotienten von unreifem APP (110kDa) zu $\beta$ -Aktin (42kDa) unter Einfluss von steigenden Konzentrationen des HDACi Scriptaid.....	60
Abbildung 26: Schematische Darstellung des molekularen Mechanismus der physiologischen APP-Bildung und der Inhibition durch HDAC-Inhibitoren.....	64

## 6.2 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Übersicht über die HDAC-Inhibitionsaktivität der in dieser Arbeit verwendeten HDACi und Valproat – modifiziert nach Blackwell et al. (2008), aktualisiert nach Mai et al. (2003); Vrba et al. (2011); Ota et al. (2005); Mai et al. (2005); Ono et al. (2010).....	10
Tabelle 2: Übersicht zur Darstellung meiner Arbeitshypothesen und die daraus folgende Methodik .....	12
Tabelle 3: Einstellungen „ <i>Viewfinder/Studio</i> “ für die Aufnahme der Immunfluoreszenz von Sw480-Zellen unter dem Einfluss von Apicidin .....	26
Tabelle 4: Einstellungen „ <i>Viewfinder/Studio</i> “ für die Aufnahme der Immunfluoreszenz von BxPc3-Zellen.....	27

### 6.3 Abkürzungsverzeichnis

A $\beta$	Beta Amyloid
A $\beta$ 42	Beta-Amyloid 42
Acetyl-CoA	Acetyl-Coenzym A
ADAM10	A Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein 10
ADP	Adenosindiphosphat
AICD	APP intracellular domain
ANOVA	analysis of variance
APC	adenoma polyposis coli
APLP1/APLP2	amyloid precursor-like proteins
APP	amyloid precursor protein, Amyloid-Vorläufer-Protein
APPs $\beta$	large secreted ectodomain fragment
ATF-6	activating transcription factor 6
ATP	Adenosintriphosphat
Bcl-2	B-cell lymphoma 2
bFGF	basic fibroblast growth factor
BiP	binding immunoglobulin protein
BSA	Bovines Serumalbumin
CAPPD	central APP domain
CDK-Inhibitor	Cyclin-dependent kinase
CO <sub>2</sub>	Kohlenstoffdioxid
CTF	C-terminal fragment
CuBD	copper-binding domain
DAPI	4',6-Diamidino-2-phenylindol-Dihydrochlorid
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNS	Desoxyribonukleinsäure
DPBS	Dulbecco's phosphate-buffered saline
EDTA	Ethylendiamintetraessigsäure
EGF	epidermal growth factor
ER	Endoplasmatisches Retikulum/Östrogenrezeptor
ERAD	endoplasmatic-reticulum-associated protein degradation
Fc-Region	fragment crystallizable region
FCS	fetal calf serum
FDA	Food and Drug Administration
GRP78	glucose-regulated protein 78
H4ac	Hyperacetyliertes Histon-H4
HAT	Histon-Acetyltransferase
hda1	histone deacetylase 1
HDAC(s)	Histon-Deacetylase(n)
HDACi	Histon-Deacetylase-Inhibitor
HIF1 $\alpha$	hypoxia-inducible factor 1 $\alpha$
HRP	horseradish peroxidase
HSP	Hitzeschockproteine
HSPA5	heat shock protein 5



---

HSV	Herpes-simplex-Virus
IRE1	endoplasmic reticulum to nucleus signaling 1
kDa	Kilodalton
MPR	misfolded protein response
MTS	3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)-2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium
NADH <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinukleotid
NADPH <sup>+</sup>	Nicotinamidadenindinukleotidphosphat
NGF	nerve growth factor
PERK	protein kinase RNA-like endoplasmic reticulum kinase
PBS	phosphatgepufferte Salzlösung
PMS	Phenazinmethosulfat
RAR-beta	retinoic acid receptor beta
RB1	Retinoblastom-Protein
RERMS	APP328-332
RNA	Ribonukleinsäure
ROS	Reaktive Sauerstoffspezies
Rpd3	reduced potassium dependency 3
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
SAHA	suberoylanilide hydroxamic acid
sAPP $\alpha$	secreted APP alpha
SDS	Sodiumdodecylsulfat
Sir2	silent information regulator 2
siRNA	small interfering RNA
TBS-T	Tris-Buffered Saline und Tween 20
TGF- $\alpha$	transforming growth factor alpha
TNF	Tumornekrosefaktor
TRAIL	TNF-related apoptosis-inducing ligand
TSA	Trichostatin A
UPR	unfolded protein response
UV	Ultraviolett
V	Volt
VEGF	vascular endothelial growth factor
WHO	World Health Organization
YENPTY	Internalisationsmotiv

## 7 Literaturverzeichnis

---

- Adcock IM. (2007): HDAC inhibitors as anti-inflammatory agents. *Br J Pharmacol* 150, 829–831
- Ahn MY, Chung HY, Choi WS, Lee BM, Yoon S, Kim HS. (2010): Anti-tumor effect of apicidin on Ishikawa human endometrial cancer cells both in vitro and in vivo by blocking histone deacetylase 3 and 4. *Int J Oncol* 36, 125–131
- Ahn MY, Ahn SG, Yoon JH. (2011): Apicidin, a histone deacetylase inhibitor, induces both apoptosis and autophagy in human oral squamous carcinoma cells. *Oral Oncol* 47, 1032–1038
- Andrews KT, Walduck A, Kelso MJ, Fairlie DP, Saul A, Parsons PG. (2000): Anti-malarial effect of histone deacetylation inhibitors and mammalian tumour cytodifferentiating agents. *Int J Parasitol* 30, 761–768
- Archer SY, Hodin RA. (1999): Histone acetylation and cancer. *Curr Opin Genet Dev* 9, 171–174
- Avalos JL, Bever KM, Wolberger C. (2005): Mechanism of Sirtuin Inhibition by Nicotinamide: Altering the NAD<sup>+</sup> Cosubstrate Specificity of a Sir2 Enzyme. *Mol Cell* 17, 855–868
- Bali P, Pranpat M, Bradner J, Balasis M, Fiskus W, Guo F, Rocha K, Kumaraswamy S, Boyapalle S, Atadja P, Seto E, Bhalla K. (2005): Inhibition of Histone Deacetylase 6 Acetylates and Disrupts the Chaperone Function of Heat Shock Protein 90. *J Biol Chem* 280, 26729–26734
- Bao L, Kimzey A, Sauter G, Sowadski JM, Lu KP, Wang D-G. (2004): Prevalent overexpression of prolyl isomerase Pin1 in human cancers. *Am J Pathol* 164, 1727–1737
- Barghorn S, Nimmrich V, Striebinger A, Krantz C, Keller P, Janson B, Bahr M, Schmidt M, Bitner RS, Harlan J, Barlow E, Ebert U, Hillen H. (2005): Globular amyloid beta-peptide oligomer - a homogenous and stable neuropathological protein in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 95, 834–847
- Bateman DA. (2006): Unfolded Protein Response (UPR): Cellular control for our errors in life. *Hypothesis* 4, 33

- Batra S, Sahu RP, Kandala PK, Srivastava SK. (2010): Benzyl Isothiocyanate–Mediated Inhibition of Histone Deacetylase Leads to NF- $\kappa$ B Turnoff in Human Pancreatic Carcinoma Cells. *Mol Cancer Ther* 9, 1596–1608
- Baumeister P, Dong D, Fu Y, Lee AS. (2009): Transcriptional induction of GRP78/BiP by histone deacetylase inhibitors and resistance to histone deacetylase inhibitor–induced apoptosis. *Mol Cancer Ther* 8, 1086–1094
- Berridge MV, Tan AS. (1993): Characterization of the cellular reduction of 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT): subcellular localization, substrate dependence, and involvement of mitochondrial electron transport in MTT reduction. *Arch Biochem Biophys* 303, 474–482
- Beutler AS, Li S, Nicol R, Walsh MJ. (2005): Carbamazepine is an inhibitor of histone deacetylases. *Life Sci* 76, 3107–3115
- Blackwell L, Norris J, Suto CM, Janzen WP. (2008): The use of diversity profiling to characterize chemical modulators of the histone deacetylases. *Life Sci* 82, 1050–1058
- Blander G, Guarente L. (2004): The Sir2 family of protein deacetylases. *Annu Rev Biochem* 73, 417–435
- Botelho MG, Wang X, Arndt-Jovin DJ, Becker D, Jovin TM. (2010): Induction of Terminal Differentiation in Melanoma Cells on Downregulation of [beta]-Amyloid Precursor Protein. *J Invest Dermatol* 130, 1400–1410
- Brehm A, Miska EA, McCance DJ, Reid JL, Bannister AJ, Kouzarides T. (1998): Retinoblastoma protein recruits histone deacetylase to repress transcription. *Nature* 391, 597–601
- Breitenstein A, Stein S, Holy EW, Camici GG, Lohmann C, Akhmedov A, Spescha R, Elliott PJ, Westphal CH, Matter CM, Lüscher TF, Tanner FC. (2011): Sirt1 inhibition promotes in vivo arterial thrombosis and tissue factor expression in stimulated cells. *Cardiovasc Res* 89, 464–472
- Bush AI, Multhaup G, Moir RD, Williamson TG, Small DH, Rumble B, Pollwein P, Beyreuther K, Masters CL. (1993): A novel zinc(II) binding site modulates the function of the beta A4 amyloid protein precursor of Alzheimer’s disease. *J Biol Chem* 268, 16109–16112

- Caillé I, Allinquant B, Dupont E, Bouillot C, Langer A, Müller U, Prochiantz A. (2004): Soluble form of amyloid precursor protein regulates proliferation of progenitors in the adult subventricular zone. *Development* 131, 2173–2181
- Calderwood SK, Khaleque MA, Sawyer DB, Ciocca DR. (2006): Heat shock proteins in cancer: chaperones of tumorigenesis. *Trends Biochem Sci* 31, 164–172
- Candelaria M, Gallardo-Rincón D, Arce C, Cetina L, Aguilar-Ponce J, Arrieta Ó, González-Fierro A, Chávez-Blanco A, Cruz-Hernández E de la, Camargo M, Trejo-Becerril C, Pérez-Cárdenas E, Pérez-Plasencia C, Taja-Chayeb L, Wegman-Ostrosky T, Revilla-Vazquez A, Dueñas-González A. (2007): A phase II study of epigenetic therapy with hydralazine and magnesium valproate to overcome chemotherapy resistance in refractory solid tumors. *Ann Oncol* 18, 1529–1538
- Chen WJ, Goldstein JL, Brown MS. (1990): NPXY, a sequence often found in cytoplasmic tails, is required for coated pit-mediated internalization of the low density lipoprotein receptor. *J Biol Chem* 265, 3116–3123
- Cheong JW, Chong SY, Kim JY, Eom JI, Jeung HK, Maeng HY, Lee ST, Min YH. (2003): Induction of Apoptosis by Apicidin, a Histone Deacetylase Inhibitor, via the Activation of Mitochondria-Dependent Caspase Cascades in Human Bcr-Abl-Positive Leukemia Cells. *Clin Cancer Res* 9, 5018–5027
- Cheung WL, Briggs SD, Allis CD. (2000): Acetylation and chromosomal functions. *Curr Opin Cell Biol* 12, 326–333
- Choi J, Kwon HJ, Yoon B, Kim J, Han SU, Joo HJ, Kim D. (2001): Expression Profile of Histone Deacetylase 1 in Gastric Cancer Tissues. *Cancer Sci* 92, 1300–1304
- Chowdhury P, Rayford PL. (2000): Smoking and pancreatic disorders. *Eur J Gastroenterol Hepatol* 12, 869–877
- Codd R, Braich N, Liu J, Soe CZ, Pakchung AAH. (2009): Zn(II)-dependent histone deacetylase inhibitors: suberoylanilide hydroxamic acid and trichostatin A. *Int J Biochem Cell Biol* 41, 736–739
- Dahms SO, Hoefgen S, Roeser D, Schlott B, Gührs K-H, Than ME. (2010): Structure and biochemical analysis of the heparin-induced E1 dimer of the amyloid precursor protein. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 5381–5386

- Darkin-Rattray SJ, Gurnett AM, Myers RW, Dulski PM, Crumley TM, Allocco JJ, Cannova C, Meinke PT, Colletti SL, Bednarek MA, Singh SB, Goetz MA, Dombrowski AW, Polishook JD, Schmatz DM. (1996): Apicidin: A novel antiprotozoal agent that inhibits parasite histone deacetylase. *Proc Natl Acad Sci U S A* 93, 13143–13147
- Deroanne CF, Bonjean K, Servotte S, Devy L, Colige A, Clausse N, Blacher S, Verdin E, Foidart J-M, Nusgens BV, Castronovo V. (2002): Histone deacetylases inhibitors as anti-angiogenic agents altering vascular endothelial growth factor signaling. *Oncogene* 21, 427–436
- Dinarello CA, Fossati G, Mascagni P. (2011): Histone deacetylase inhibitors for treating a spectrum of diseases not related to cancer. *Mol Med* 17, 333–352
- Donmez G, Wang D, Cohen DE, Guarente L. (2010): SIRT1 Suppresses  $\beta$ -amyloid Production by Activating the  $\alpha$ -Secretase Gene ADAM10. *Cell* 142, 320–332
- Dorigo B, Schalch T, Bystricky K, Richmond TJ. (2003): Chromatin fiber folding: requirement for the histone H4 N-terminal tail. *J Mol Biol* 327, 85–96
- Dorner AJ, Bole DG, Kaufman RJ. (1987): The relationship of N-linked glycosylation and heavy chain-binding protein association with the secretion of glycoproteins. *J Cell Biol* 105, 2665–2674
- Driver JA, Lu KP. (2010): Pin1: a new genetic link between Alzheimer’s disease, cancer and aging. *Curr Aging Sci* 3, 158–165
- Duce JA, Tsatsanis A, Cater MA, James SA, Robb E, Wikhe K, Leong SL, Perez K, Johansen T, Greenough MA, Cho H-H, Galatis D, Moir RD, Masters CL, McLean C, Tanzi RE, Cappai R, Barnham KJ, Ciccotosto GD, Rogers JT, Bush AI. (2010): Iron-Export Ferroxidase Activity of  $\beta$ -Amyloid Precursor Protein Is Inhibited by Zinc in Alzheimer’s Disease. *Cell* 142, 857–867
- Esch F, Keim P, Beattie E, Blacher R, Culwell A, Oltersdorf T, McClure D, Ward P. (1990): Cleavage of amyloid beta peptide during constitutive processing of its precursor. *Science* 248, 1122–1124
- Eyal S, Yagen B, Sobol E, Altschuler Y, Shmuel M, Bialer M. (2004): The activity of antiepileptic drugs as histone deacetylase inhibitors. *Epilepsia* 45, 737–744
- Fantin VR, Richon VM. (2007): Mechanisms of Resistance to Histone Deacetylase Inhibitors and Their Therapeutic Implications. *Clin Cancer Res* 13, 7237–7242

- Fenrick R, Hiebert SW. (1998): Role of histone deacetylases in acute leukemia. *J Cell Biochem Suppl* 30-31, 194–202
- Ferri CP, Prince M, Brayne C, Brodaty H, Fratiglioni L, Ganguli M, Hall K, Hasegawa K, Hendrie H, Huang Y, Jorm A, Mathers C, Menezes PR, Rimmer E, Scazufca M. (2005): Global prevalence of dementia: a Delphi consensus study. *The Lancet* 366, 2112–2117
- Finnin MS, Donigian JR, Cohen A, Richon VM, Rifkind RA, Marks PA, Breslow R, Pavletich NP. (1999): Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. *Nature* 401, 188–193
- Fitzgerald LA, Phillips DR. (1985): Calcium regulation of the platelet membrane glycoprotein IIb-IIIa complex. *J Biol Chem* 260, 11366–11374
- Gallo P, Latronico MVG, Gallo P, Grimaldi S, Borgia F, Todaro M, Jones P, Gallinari P, Francesco R De, Ciliberto G, Steinkühler C, Esposito G, Condorelli G. (2008): Inhibition of class I histone deacetylase with an apicidin derivative prevents cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc Res* 80, 416–424
- Gething MJ. (1999): Role and regulation of the ER chaperone BiP. *Semin Cell Dev Biol* 10, 465–472
- Ghiran IC. (2011): Introduction to fluorescence microscopy. *Methods Mol Biol* 689, 93–136
- Glaser KB, Staver MJ, Waring JF, Stender J, Ulrich RG, Davidsen SK. (2003): Gene expression profiling of multiple histone deacetylase (HDAC) inhibitors: defining a common gene set produced by HDAC inhibition in T24 and MDA carcinoma cell lines. *Mol Cancer Ther* 2, 151–163
- Gray CW, Patel AJ. (1993): Induction of beta-amyloid precursor protein isoform mRNAs by bFGF in astrocytes. *Neuroreport* 4, 811–814
- Gray SG, Ekström TJ. (2001): The human histone deacetylase family. *Exp Cell Res* 262, 75–83
- Gregoretta IV, Lee YM, Goodson HV. (2004): Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. *J Mol Biol* 338, 17–31
- Grunstein M. (1997): Histone acetylation in chromatin structure and transcription. *Nature* 389, 349–352

- Haass C, Koo EH, Mellon A, Hung AY, Selkoe DJ. (1992a): Targeting of cell-surface beta-amyloid precursor protein to lysosomes: alternative processing into amyloid-bearing fragments. *Nature* 357, 500–503
- Haass C, Schlossmacher MG, Hung AY, Vigo-Pelfrey C, Mellon A, Ostaszewski BL, Lieberburg I, Koo EH, Schenk D, Teplow DB. (1992b): Amyloid beta-peptide is produced by cultured cells during normal metabolism. *Nature* 359, 322–325
- Haass C, Hung AY, Schlossmacher MG, Teplow DB, Selkoe DJ. (1993): beta-Amyloid peptide and a 3-kDa fragment are derived by distinct cellular mechanisms. *J Biol Chem* 268, 3021–3024
- Hahn SA, Schmiegel WH. (1998): Recent discoveries in cancer genetics of exocrine pancreatic neoplasia. *Digestion* 59, 493–501
- Han JW, Ahn SH, Park SH, Wang SY, Bae GU, Seo DW, Kwon H-K, Hong S, Lee HY, Lee YW, Lee HW. (2000): Apicidin, a Histone Deacetylase Inhibitor, Inhibits Proliferation of Tumor Cells via Induction of p21WAF1/Cip1 and Gelsolin. *Cancer Res* 60, 6068–6074
- Hanahan D, Weinberg RA. (2000): The Hallmarks of Cancer. *Cell* 100, 57–70
- Hansel DE, Rahman A, Wehner S, Herzog V, Yeo CJ, Maitra A. (2003): Increased Expression and Processing of the Alzheimer Amyloid Precursor Protein in Pancreatic Cancer May Influence Cellular Proliferation. *Cancer Res* 63, 7032–7037
- Hashimoto M, Rockenstein E, Crews L, Masliah E. (2003): Role of protein aggregation in mitochondrial dysfunction and neurodegeneration in Alzheimer's and Parkinson's diseases. *Neuromolecular Med* 4, 21–36
- Haven CJ, Howell VM, Eilers PHC, Dunne R, Takahashi M, Puijtenbroek M van, Furge K, Kievit J, Tan M-H, Fleuren GJ, Robinson BG, Delbridge LW, Philips J, Nelson AE, Krause U, Dralle H, Hoang-Vu C, Gimm O, Morreau H, Marsh DJ, Teh BT. (2004): Gene expression of parathyroid tumors: molecular subclassification and identification of the potential malignant phenotype. *Cancer Res* 64, 7405–7411
- Heemst D van, Mooijaart SP, Beekman M, Schreuder J, Craen AJM de, Brandt BW, Eline Slagboom P, Westendorp RGJ, 'Long Life' study group on behalf of the. (2005): Variation in the human TP53 gene affects old age survival and cancer mortality. *Exp Gerontol* 40, 11–15
- Helenius A, Simons K. (1975): Solubilization of membranes by detergents. *Biochim Biophys Acta* 415, 29–79

- Hoffmann J, Twisselmann C, Kummer MP, Romagnoli P, Herzog V. (2000): A possible role for the Alzheimer amyloid precursor protein in the regulation of epidermal basal cell proliferation. *Eur J Cell Biol* 79, 905–914
- Hong L, Schroth GP, Matthews HR, Yau P, Bradbury EM. (1993): Studies of the DNA binding properties of histone H4 amino terminus. Thermal denaturation studies reveal that acetylation markedly reduces the binding constant of the H4 „tail“ to DNA. *J Biol Chem* 268, 305–314
- Im JY, Park H, Kang KW, Choi WS, Kim HS. (2008): Modulation of cell cycles and apoptosis by apicidin in estrogen receptor (ER)-positive and-negative human breast cancer cells. *Chem Biol Interact* 172, 235–244
- Ito A, Kawaguchi Y, Lai CH, Kovacs JJ, Higashimoto Y, Appella E, Yao T-P. (2002): MDM2-HDAC1-mediated deacetylation of p53 is required for its degradation. *EMBO J* 21, 6236–6245
- Jang H, Arce FT, Ramachandran S, Capone R, Azimova R, Kagan BL, Nussinov R, Lal R. (2010): Truncated  $\beta$ -amyloid peptide channels provide an alternative mechanism for Alzheimer’s Disease and Down syndrome. *Proc Natl Acad Sci U S A* 107, 6538 –6543
- Jarrett JT, Berger EP, Lansbury PT Jr. (1993): The carboxy terminus of the beta amyloid protein is critical for the seeding of amyloid formation: implications for the pathogenesis of Alzheimer’s disease. *Biochemistry* 32, 4693–4697
- Jean T. (1999): Histone H1: location and role. *Curr Opin Cell Biol* 11, 312–317
- Jemal A, Murray T, Ward E, Samuels A, Tiwari RC, Ghafoor A, Feuer EJ, Thun MJ. (2005): Cancer statistics, 2005. *CA Cancer J Clin* 55, 10–30
- Jenuwein T, Allis CD. (2001): Translating the histone code. *Science* 293, 1074–1080
- Jin KL, Park JY, Noh EJ, Hoe KL, Lee JH, Kim JH, Nam JH. (2010): The effect of combined treatment with cisplatin and histone deacetylase inhibitors on HeLa cells. *J Gynecol Oncol* 21, 262–268
- Jin YH, Jeon EJ, Li QL, Lee YH, Choi JK, Kim WJ, Lee KY, Bae SC. (2004): Transforming Growth Factor- $\beta$  Stimulates p300-dependent RUNX3 Acetylation, Which Inhibits Ubiquitination-mediated Degradation. *J Biol Chem* 279, 29409 –29417
- Johnson J, Hunter R, McElveen R, Qian XH, Baliga BS, Pace BS. (2005): Fetal hemoglobin induction by the histone deacetylase inhibitor, scriptaid. *Cell Mol Biol* 51, 229–238



- Johnstone RW. (2002): Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nat Rev Drug Discov* 1, 287–299
- Kakimura J, Kitamura Y, Takata K, Tsuchiya D, Taniguchi T, Gebicke-Haerter PJ, Smith MA, Perry G, Shimohama S. (2002): Possible Involvement of ER Chaperone Grp78 on Reduced Formation of Amyloid- $\beta$  Deposits. *Ann N Y Acad Sci* 977, 327–332
- Kao HY, Lee CH, Komarov A, Han CC, Evans RM. (2002): Isolation and Characterization of Mammalian HDAC10, a Novel Histone Deacetylase. *J Biol Chem* 277, 187–193
- Kazantsev AG, Thompson LM. (2008): Therapeutic application of histone deacetylase inhibitors for central nervous system disorders. *Nature* 7, 854–868
- Keen JC, Yan L, Mack KM, Pettit C, Smith D, Sharma D, Davidson NE. (2003): 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* 81, 177–186
- Khan O, Thangue NBL. (2012): HDAC inhibitors in cancer biology: emerging mechanisms and clinical applications. *Immunol Cell Biol* 90, 85–94
- Kilgore M, Miller CA, Fass DM, Hennig KM, Haggarty SJ, Sweatt JD, Rumbaugh G. (2010): Inhibitors of Class 1 Histone Deacetylases Reverse Contextual Memory Deficits in a Mouse Model of Alzheimer's Disease. *Neuropsychopharmacology* 35, 870–880
- Kim HJ, Bae SC. (2011): Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action and clinical trials as anti-cancer drugs. *Am J Transl Res* 3, 166–179
- King LS, Berg M, Chevalier M, Carey A, Elguindi EC, Blond SY. (2001): Isolation, expression, and characterization of fully functional nontoxic BiP/GRP78 mutants. *Protein Expr Purif* 22, 148–158
- Knudson AG Jr. (1971): Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA* 68, 820–823
- Ko SY, Lin SC, Chang KW, Wong YK, Liu CJ, Chi CW, Liu TY. (2004): Increased expression of amyloid precursor protein in oral squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 111, 727–732
- Kokubo H, Kaye R, Glabe CG, Yamaguchi H. (2005): Soluble A $\beta$  oligomers ultrastructurally localize to cell processes and might be related to synaptic dysfunction in Alzheimer's disease brain. *Brain Res* 1031, 222–228

- König G, Mönning U, Czech C, Prior R, Banati R, Schreiter-Gasser U, Bauer J, Masters CL, Beyreuther K. (1992): Identification and differential expression of a novel alternative splice isoform of the beta A4 amyloid precursor protein (APP) mRNA in leukocytes and brain microglial cells. *J Biol Chem* 267, 10804
- Koo E, Squazzo SL. (1994): Evidence that production and release of amyloid beta-protein involves the endocytic pathway. *J Biol Chem* 269, 17386–17389
- Koo E, Squazzo S, Selkoe D, Koo C. (1996): Trafficking of cell-surface amyloid beta-protein precursor. I. Secretion, endocytosis and recycling as detected by labeled monoclonal antibody. *J Cell Sci* 109, 991–998
- Kornberg RD, Lorch Y. (1999): Twenty-five years of the nucleosome, fundamental particle of the eukaryote chromosome. *Cell* 98, 285–294
- Krause K, Karger S, Sheu S-Y, Aigner T, Kursawe R, Gimm O, Schmid K-W, Dralle H, Fuhrer D. (2008): Evidence for a role of the amyloid precursor protein in thyroid carcinogenesis. *J Endocrinol* 198, 291–299
- Krishan A. (2005): DAPI Fluorescence in Nuclei Isolated from Tumors. *J Histochem Cytochem* 53, 1033–1036
- Kuribayashi T, Ohara M, Sora S, Kubota N. (2010): Scriptaid, a novel histone deacetylase inhibitor, enhances the response of human tumor cells to radiation. *Int J Mol Med* 25, 25–29
- Kwon SH, Ahn SH, Kim YK, Bae GU, Yoon JW, Hong S, Lee HY, Lee YW, Lee HW, Han JW. (2002): Apicidin, a Histone Deacetylase Inhibitor, Induces Apoptosis and Fas/Fas Ligand Expression in Human Acute Promyelocytic Leukemia Cells. *J Biol Chem* 277, 2073 – 2080
- Lai A, Sisodia SS, Trowbridge IS. (1995): Characterization of sorting signals in the beta-amyloid precursor protein cytoplasmic domain. *J Biol Chem* 270, 3565–3573
- Lee EJ, Lee BB, Kim SJ, Park YD, Park J, Kim DH. (2008): Histone deacetylase inhibitor scriptaid induces cell cycle arrest and epigenetic change in colon cancer cells. *Int J Oncol* 33, 767–776
- Li Y, Xu W, McBurney MW, Longo VD. (2008): SirT1 Inhibition Reduces IGF-I/IRS-2/Ras/ERK1/2 Signaling and Protects Neurons. *Cell Metab* 8, 38–48

- Lim J, Balastik M, Lee TH, Nakamura K, Liou YC, Sun A, Finn G, Pastorino L, Lee VM, Lu KP. (2008): Pin1 has opposite effects on wild-type and P301L tau stability and tauopathy. *J Clin Invest* 118, 1877–1889
- Lint C Van, Emiliani S, Verdin E. (1996): The expression of a small fraction of cellular genes is changed in response to histone hyperacetylation. *Gene Expr* 5, 245–253
- Liou YC, Sun A, Ryo A, Zhou XZ, Yu ZX, Huang HK, Uchida T, Bronson R, Bing G, Li X, Hunter T, Lu KP. (2003): Role of the prolyl isomerase Pin1 in protecting against age-dependent neurodegeneration. *Nature* 424, 556–561
- Liu CY, Kaufman RJ. (2003): The unfolded protein response. *J Cell Sci* 116, 1861–1862
- Lu J, Hu Z, Wei S, Wang LE, Liu Z, El-Naggar AK, Sturgis EM, Wei Q. (2009): A novel functional variant (–842G>C) in the PIN1 promoter contributes to decreased risk of squamous cell carcinoma of the head and neck by diminishing the promoter activity. *Carcinogenesis* 30, 1717–1721
- Lu PJ, Wulf G, Zhou XZ, Davies P, Lu KP. (1999): The prolyl isomerase Pin1 restores the function of Alzheimer-associated phosphorylated tau protein. *Nature* 399, 784–788
- Mai A, Massa S, Ragno R, Esposito M, Sbardella G, Nocca G, Scatena R, Jesacher F, Loidl P, Brosch G. (2002): Binding mode analysis of 3-(4-benzoyl-1-methyl-1H-2-pyrrolyl)-N-hydroxy-2-propenamide: a new synthetic histone deacetylase inhibitor inducing histone hyperacetylation, growth inhibition, and terminal cell differentiation. *J Med Chem* 45, 1778–1784
- Mai A, Massa S, Ragno R, Cerbara I, Jesacher F, Loidl P, Brosch G. (2003): 3-(4-Aroyl-1-methyl-1H-2-pyrrolyl)-N-hydroxy-2-alkylamides as a new class of synthetic histone deacetylase inhibitors. 1. Design, synthesis, biological evaluation, and binding mode studies performed through three different docking procedures. *J Med Chem* 46, 512–524
- Mai A, Massa S, Lavu S, Pezzi R, Simeoni S, Ragno R, Mariotti FR, Chiani F, Camilloni G, Sinclair DA. (2005): Design, synthesis, and biological evaluation of sirtinol analogues as class III histone/protein deacetylase (Sirtuin) inhibitors. *J Med Chem* 48, 7789–7795
- Marks PA. (2010): The clinical development of histone deacetylase inhibitors as targeted anticancer drugs. *Expert Opin Investig Drugs* 19, 1049–1066
- Marks PA, Xu W. (2009): Histone deacetylase inhibitors: Potential in cancer therapy. *J Cell Biochem* 107, 600–608

- Miller L. (2010): Analyzing gels and western blots with ImageJ.  
<http://lukemiller.org/index.php/2010/11/analyzing-gels-and-western-blots-with-image-j/>
- Mills J, Reiner PB. (1999): Regulation of amyloid precursor protein cleavage. *J Neurochem* 72, 443–460
- Minucci S, Pelicci PG. (2006): Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat Rev Cancer* 6, 38–51
- Mobley WC, Neve RL, Prusiner SB, McKinley MP. (1988): Nerve growth factor increases mRNA levels for the prion protein and the beta-amyloid protein precursor in developing hamster brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 85, 9811–9815
- Moreno H, Yu E, Pigino G, Hernandez AI, Kim N, Moreira JE, Sugimori M, Llinás RR. (2009): Synaptic transmission block by presynaptic injection of oligomeric amyloid beta. *Proc Natl Acad Sci U S A* 106, 5901–5906
- Müller S, Krämer OH. (2010): Inhibitors of HDACs--effective drugs against cancer? *Curr Cancer Drug Targets* 10, 210–228
- Multhaup G, Bush AI, Pollwein P, Masters CL, Beyreuther K. (1992): Specific binding of the alzheimer  $\beta$ A4 amyloid precursor to collagen, laminin, and heparin. *J Protein Chem* 11, 398–399
- Murr MM, Sarr MG, Oishi AJ, Heerden JA van. (1994): Pancreatic cancer. *CA Cancer J Clin* 44, 304–318
- Nickels M. (2004): The Saga Of SAHA: Histone Deacetylase Inhibitors As Anti-Cancer Agents.  
[http://chemistry.illinois.edu/research/organic/seminar\\_extracts/2003\\_2004/Nickels.pdf](http://chemistry.illinois.edu/research/organic/seminar_extracts/2003_2004/Nickels.pdf)
- Ninomiya H, Roch JM, Sundsmo MP, Otero DA, Saitoh T. (1993): Amino acid sequence RERMS represents the active domain of amyloid beta/A4 protein precursor that promotes fibroblast growth. *J Cell Biol* 121, 879–886
- Ohnishi S, Takano K. (2004): Amyloid fibrils from the viewpoint of protein folding. *Cell Mol Life Sci* 61, 511–524
- Ono T, Li C, Mizutani E, Terashita Y, Yamagata K, Wakayama T. (2010): Inhibition of class IIb histone deacetylase significantly improves cloning efficiency in mice. *Biol Reprod* 83, 929–937

Orecchia A, Scarponi C, Felice F Di, Cesarini E, Avitabile S, Mai A, Mauro ML, Sirri V, Zambruno G, Albanesi C, Camilloni G, Failla CM. (2011): Sirtinol treatment reduces inflammation in human dermal microvascular endothelial cells. *PLoS ONE* 6, e24307

Osada H, Tatematsu Y, Saito H, Yatabe Y, Mitsudomi T, Takahashi T. (2004): Reduced expression of class II histone deacetylase genes is associated with poor prognosis in lung cancer patients. *Int J Cancer* 112, 26–32

Ota H, Tokunaga E, Chang K, Hikasa M, Iijima K, Eto M, Kozaki K, Akishita M, Ouchi Y, Kaneki M. (2005): Sirt1 inhibitor, Sirtinol, induces senescence-like growth arrest with attenuated Ras-MAPK signaling in human cancer cells. *Oncogene* 25, 176–185

Otsuki A, Patel A, Kasai K, Suzuki M, Kurozumi K, Antonio Chiocca E, Saeki Y. (2008): Histone Deacetylase Inhibitors Augment Antitumor Efficacy of Herpes-based Oncolytic Viruses. *Mol Ther* 16, 1546–1555

Peck B, Chen CY, Ho KK, Fruscia P Di, Myatt SS, Coombes RC, Fuchter MJ, Hsiao CD, Lam EW. (2010): SIRT Inhibitors Induce Cell Death and p53 Acetylation through Targeting Both SIRT1 and SIRT2. *Mol Cancer Ther* 9, 844–855

Pietrzik CU, Hoffmann J, Stöber K, Chen C-Y, Bauer C, Otero DAC, Roch J-M, Herzog V. (1998): From differentiation to proliferation: The secretory amyloid precursor protein as a local mediator of growth in thyroid epithelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* 95, 1770–1775

Priller C, Bauer T, Mitteregger G, Krebs B, Kretschmar HA, Herms J. (2006): Synapse formation and function is modulated by the amyloid precursor protein. *J Neurosci* 26, 7212–7221

Promega. (2005): Technical Bulletin: CellTiter 96@AqueousOne Solution Cell Proliferation Assay. Instructions for use of Products G3580, G3581 AND G3582.

Qian DZ, Kato Y, Shabbeer S, Wei Y, Verheul HMW, Salumbides B, Sanni T, Atadja P, Pili R. (2006): Targeting Tumor Angiogenesis with Histone Deacetylase Inhibitors: the Hydroxamic Acid Derivative LBH589. *Clin Cancer Res* 12, 634–642

Qiu L, Burgess A, Fairlie DP, Leonard H, Parsons PG, Gabrielli BG. (2000): Histone deacetylase inhibitors trigger a G2 checkpoint in normal cells that is defective in tumor cells. *Mol Biol Cell* 11, 2069–2083

Reinhard C, Hébert SS, Strooper B De. (2005): The amyloid- $\beta$  precursor protein: integrating structure with biological function. *EMBO J* 24, 3996–4006

- Richon VM, Sandhoff TW, Rifkind RA, Marks PA. (2000): Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* 97, 10014–10019
- Roch JM, Jin LW, Ninomiya H, Schubert D, Saitoh T. (1993): Biologically active domain of the secreted form of the amyloid beta/A4 protein precursor. *Ann N Y Acad Sci* 695, 149–157
- Roe CM, Behrens MI, Xiong C, Miller JP, Morris JC. (2005): Alzheimer disease and cancer. *Neurology* 64, 895–898
- Roe CM, Fitzpatrick AL, Xiong C, Sieh W, Kuller L, Miller JP, Williams MM, Kopan R, Behrens MI, Morris JC. (2010): Cancer linked to Alzheimer disease but not vascular dementia. *Neurology* 74, 106–112
- Rosato RR, Almenara JA, Grant S. (2003a): The Histone Deacetylase Inhibitor MS-275 Promotes Differentiation or Apoptosis in Human Leukemia Cells through a Process Regulated by Generation of Reactive Oxygen Species and Induction of p21CIP1/WAF1 1. *Cancer Res* 63, 3637–3645
- Rosato RR, Almenara JA, Dai Y, Grant S. (2003b): Simultaneous activation of the intrinsic and extrinsic pathways by histone deacetylase (HDAC) inhibitors and tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) synergistically induces mitochondrial damage and apoptosis in human leukemia cells. *Mol Cancer Ther* 2, 1273–1284
- Rossjohn J, Cappai R, Feil SC, Henry A, McKinstry WJ, Galatis D, Hesse L, Multhaup G, Beyreuther K, Masters CL, Parker MW. (1999): Crystal structure of the N-terminal, growth factor-like domain of Alzheimer amyloid precursor protein. *Nat Struct Mol Biol* 6, 327–331
- Rossner S, Ueberham U, Schliebs R, Perez-Polo JR, Bigl V. (1998): The regulation of amyloid precursor protein metabolism by cholinergic mechanisms and neurotrophin receptor signaling. *Prog Neurobiol* 56, 541–569
- Roth. (2009): Roti®-Quant universal: Colorimetrische Proteinkonzentrationsbestimmung.
- Ruefli AA, Ausserlechner MJ, Bernhard D, Sutton VR, Tainton KM, Kofler R, Smyth MJ, Johnstone RW. (2001): The histone deacetylase inhibitor and chemotherapeutic agent suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) induces a cell-death pathway characterized by cleavage of Bid and production of reactive oxygen species. *Proc Natl Acad Sci USA* 98, 10833–10838

- Sade H, Sarin A. (2004): Reactive oxygen species regulate quiescent T-cell apoptosis via the BH3-only proapoptotic protein BIM. *Cell Death Differ* 11, 416–423
- Saitoh T. (1989): Secreted form of amyloid  $\beta$  protein precursor is involved in the growth regulation of fibroblasts. *Cell* 58, 615–622
- Saitoh T, Sundsmo M, Roch JM, Kimura N, Cole G, Schubert D, Oltersdorf T, Schenk DB. (1989): Secreted form of amyloid beta protein precursor is involved in the growth regulation of fibroblasts. *Cell* 58, 615–622
- Sandor V, Senderowicz A, Mertins S, Sackett D, Sausville E, Blagosklonny MV, Bates SE. (2000): P21-dependent G 1 arrest with downregulation of cyclin D1 and upregulation of cyclin E by the histone deacetylase inhibitor FR901228. *Br J Cancer* 83, 817–825
- Sastre M. (2001): Presenilin-dependent gamma-secretase processing of beta-amyloid precursor protein at a site corresponding to the S3 cleavage of Notch. *EMBO Rep* 2, 835–841
- Segat L, Pontillo A, Annoni G, Trabattoni D, Vergani C, Clerici M, Arosio B, Crovella S. (2007): PIN1 promoter polymorphisms are associated with Alzheimer's disease. *Neurobiol Aging* 28, 69–74
- Selkoe DJ. (1991): The molecular pathology of Alzheimer's disease. *Neuron* 6, 487–498
- Selkoe DJ. (1998): The cell biology of beta-amyloid precursor protein and presenilin in Alzheimer's disease. *Trends Cell Biol* 8, 447–453
- Selkoe DJ. (1999): Translating cell biology into therapeutic advances in Alzheimer's disease. *Nature* 399, A23–31
- Selkoe DJ. (2001): Alzheimer's Disease: Genes, Proteins, and Therapy. *Physiol Rev* 81, 741–766
- Selkoe DJ, Wolfe MS. (2007): Presenilin: running with scissors in the membrane. *Cell* 131, 215–221
- Selkoe DJ, Podlisny MB, Joachim CL, Vickers EA, Lee G, Fritz LC, Oltersdorf T. (1988): Beta-amyloid precursor protein of Alzheimer disease occurs as 110- to 135-kilodalton membrane-associated proteins in neural and nonneural tissues. *Proc Natl Acad Sci U S A* 85, 7341–7345

Seubert P, Oltersdorf T, Lee MG, Barbour R, Blomquist C, Davis DL, Bryant K, Fritz LC, Galasko D, Thal LJ, Lieberburg I, Schenk DB. (1993): Secretion of [beta]-amyloid precursor protein cleaved at the amino terminus of the [beta]-amyloid peptide. *Nature* 361, 260–263

Sharma V, Koul N, Joseph C, Dixit D, Ghosh S, Sen E. (2010): HDAC inhibitor, scriptaid, induces glioma cell apoptosis through JNK activation and inhibits telomerase activity. *J Cell Mol Med* 14, 2151–2161

Shi Y, Gerritsma D, Bowes AJ, Capretta A, Werstuck GH. (2007): Induction of GRP78 by valproic acid is dependent upon histone deacetylase inhibition. *Bioorg Med Chem Lett* 17, 4491–4494

Sisodia SS. (1992): Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 6075–6079

Sisodia SS, Koo EH, Beyreuther K, Unterbeck A, Price DL. (1990): Evidence that beta-amyloid protein in Alzheimer's disease is not derived by normal processing. *Science* 248, 492–495

Sisodia SS, Koo EH, Hoffman P, Perry G, Price DL. (1993): Identification and transport of full-length amyloid precursor proteins in rat peripheral nervous system. *J Neurosci* 13, 3136–42

Small D, Nurcombe V, Reed G, Clarris H, Moir R, Beyreuther K, Masters C. (1994): A heparin-binding domain in the amyloid protein precursor of Alzheimer's disease is involved in the regulation of neurite outgrowth. *J Neurosci* 14, 2117–2127

Soscia SJ, Kirby JE, Washicosky KJ, Tucker SM, Ingelsson M, Hyman B, Burton MA, Goldstein LE, Duong S, Tanzi RE, Moir RD. (2010): The Alzheimer's disease-associated amyloid beta-protein is an antimicrobial peptide. *PLoS ONE* 5, e9505

Spurling CC, Godman CA, Noonan EJ, Rasmussen TP, Rosenberg DW, Giardina C. (2008): HDAC3 overexpression and colon cancer cell proliferation and differentiation. *Mol Carcinog* 47, 137–147

Strobl JS, Cassell M, Mitchell SM, Reilly CM, Lindsay DS. (2007): Scriptaid and Suberoylanilide Hydroxamic Acid are Histone Deacetylase Inhibitors with Potent Anti-Toxoplasma Gondii Activity in Vitro. *J Parasitol* 93, 694–700



Su GH, Sohn TA, Ryu B, Kern SE. (2000): A Novel Histone Deacetylase Inhibitor Identified by High-Throughput Transcriptional Screening of a Compound Library. *Cancer Res* 60, 3137–3142

Sultana R, Boyd-Kimball D, Poon HF, Cai J, Pierce WM, Klein JB, Markesbery WR, Zhou XZ, Lu KP, Butterfield DA. (2006): Oxidative modification and down-regulation of Pin1 in Alzheimer's disease hippocampus: A redox proteomics analysis. *Neurobiol Aging* 27, 918–925

Suzuki N, Cheung T, Cai X, Odaka A, Otvos L, Eckman C, Golde T, Younkin S. (1994): An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science* 264, 1336–1340

Takai N, Ueda T, Nishida M, Nasu K, Narahara H. (2006): A novel histone deacetylase inhibitor, Scriptaid, induces growth inhibition, cell cycle arrest and apoptosis in human endometrial cancer and ovarian cancer cells. *Int J Mol Med* 17, 323–329

Takayama K, Tsutsumi S, Suzuki T, Horie-Inoue K, Ikeda K, Kaneshiro K, Fujimura T, Kumagai J, Urano T, Sakaki Y, Shirahige K, Sasano H, Takahashi S, Kitamura T, Ouchi Y, Aburatani H, Inoue S. (2009): Amyloid Precursor Protein Is a Primary Androgen Target Gene That Promotes Prostate Cancer Growth. *Cancer Res* 69, 137–142

Tan J, Cang S, Ma Y, Petrillo RL, Liu D. (2010): Novel histone deacetylase inhibitors in clinical trials as anti-cancer agents. *J Hematol Oncol* 3, 3-5

Tanious FA, Veal JM, Buczak H, Ratmeyer LS, Wilson WD. (1992): DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole) binds differently to DNA and RNA: minor-groove binding at AT sites and intercalation at AU sites. *Biochemistry* 31, 3103–3112

Taylor DM, Maxwell MM, Luthi-Carter R, Kazantsev AG. (2008): Biological and potential therapeutic roles of sirtuin deacetylases. *Cell Mol Life Sci* 65, 4000–4018

Thangaraju M, Carswell KN, Prasad PD, Ganapathy V. (2009): Colon cancer cells maintain low levels of pyruvate to avoid cell death caused by inhibition of HDAC1/HDAC3. *Biochem J* 417, 379–389

Thomas EA, Coppola G, Desplats PA, Tang B, Soragni E, Burnett R, Gao F, Fitzgerald KM, Borok JF, Herman D, Geschwind DH, Gottesfeld JM. (2008): The HDAC inhibitor 4b ameliorates the disease phenotype and transcriptional abnormalities in Huntington's disease transgenic mice. *PNAS* 105, 15564–15569

- Tomita S, Kirino Y, Suzuki T. (1998): Cleavage of Alzheimer's Amyloid Precursor Protein (APP) by Secretases Occurs after O-Glycosylation of APP in the Protein Secretory Pathway. *J Biol Chem* 273, 6277–6284
- Towbin H, Staehelin T, Gordon J. (1979): Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. *Proc Natl Acad Sci U S A* 76, 4350–4354
- Turner PR, O'Connor K, Tate WP, Abraham WC. (2003): Roles of amyloid precursor protein and its fragments in regulating neural activity, plasticity and memory. *Prog Neurobiol* 70, 1–32
- Uchida T, Takamiya M, Takahashi M, Miyashita H, Ikeda H, Terada T, Matsuo Y, Shirouzu M, Yokoyama S, Fujimori F, Hunter T. (2003): Pin1 and Par14 peptidyl prolyl isomerase inhibitors block cell proliferation. *Chem Biol* 10, 15–24
- Ueda T, Takai N, Nishida M, Nasu K, Narahara H. (2007): Apicidin, a novel histone deacetylase inhibitor, has profound anti-growth activity in human endometrial and ovarian cancer cells. *Int J Mol Med* 19, 301–308
- Vanhaecke T, Papeleu P, Elaut G, Rogiers V. (2004): Trichostatin A-like hydroxamate histone deacetylase inhibitors as therapeutic agents: toxicological point of view. *Curr Med Chem* 11, 1629–1643
- Vassar R, Bennett BD, Babu-Khan S, Kahn S, Mendiaz EA, Denis P, Teplow DB, Ross S, Amarante P, Loeloff R, Luo Y, Fisher S, Fuller J, Edenson S, Lile J, Jarosinski MA, Biere AL, Curran E, Burgess T, Louis JC, Collins F, Treanor J, Rogers G, Citron M. (1999): Beta-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by the transmembrane aspartic protease BACE. *Science* 286, 735–741
- Venkataramani V: Die Funktionsanalyse und Pharmakomodulation des Amyloid-Vorläufer-Proteins (APP) in vitro und in vivo. Med. Diss. Göttingen 2011
- Venkataramani V, Rossner C, Iffland L, Schweyer S, Tamboli IY, Walter J, Wirths O, Bayer TA. (2010): Histone Deacetylase Inhibitor Valproic Acid Inhibits Cancer Cell Proliferation via Down-regulation of the Alzheimer Amyloid Precursor Protein. *J Biol Chem* 285, 10678–10689
- Venkataramani V, Thiele K, Behnes CL, Wulf GG, Thelen P, Opitz L, Salinas-Riester G, Wirths O, Bayer TA, Schweyer S. (2012): Amyloid Precursor Protein Is a Biomarker for Transformed Human Pluripotent Stem Cells. *Am J Pathol* 180, 1636-1652

- Verdin E, Dequiedt F, Kasler HG. (2003): Class II histone deacetylases: versatile regulators. *Trends Genet* 19, 286–293
- Vigushin DM, Coombes RC. (2004): Targeted histone deacetylase inhibition for cancer therapy. *Curr Cancer Drug Targets* 4, 205–218
- Voelter-Mahlknecht S, Ho AD, Mahlkecht U. (2005): Chromosomal organization and localization of the novel class IV human histone deacetylase 11 gene. *Int J Mol Med* 16, 589–598
- Vrba J, Trtkova K, Ulrichova J. (2011): HDAC inhibitors sodium butyrate and sodium valproate do not affect human ncor1 and ncor2 gene expression in HL-60 cells. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub* 155, 259–262
- Wang R, Meschia JF, Cotter RJ, Sisodia SS. (1991): Secretion of the beta/A4 amyloid precursor protein. Identification of a cleavage site in cultured mammalian cells. *J Biol Chem* 266, 16960–16964
- Wasco W, Bupp K, Magendantz M, Gusella JF, Tanzi RE, Solomon F. (1992): Identification of a mouse brain cDNA that encodes a protein related to the Alzheimer disease-associated amyloid beta protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* 89, 10758–10762
- Wasco W, Gurubhagavatula S, Paradis MD, Romano DM, Sisodia SS, Hyman BT, Neve RL, Tanzi RE. (1993): Isolation and characterization of APLP2 encoding a homologue of the Alzheimer's associated amyloid beta protein precursor. *Nat Genet* 5, 95–100
- Weidemann A, König G, Bunke D, Fischer P, Salbaum JM, Masters CL, Beyreuther K. (1989): Identification, biogenesis, and localization of precursors of Alzheimer's disease A4 amyloid protein. *Cell* 57, 115–126
- Weng WC, Lee WT, Hsu WM, Chang BE, Lee H. (2011): Role of glucose-regulated Protein 78 in embryonic development and neurological disorders. *J Formos Med Assoc* 110, 428–437
- Wilson AJ, Byun DS, Popova N, Murray LB, L'Italien K, Sowa Y, Arango D, Velcich A, Augenlicht LH, Mariadason JM. (2006): Histone Deacetylase 3 (HDAC3) and Other Class I HDACs Regulate Colon Cell Maturation and p21 Expression and Are Deregulated in Human Colon Cancer. *J Biol Chem* 281, 13548–13558
- Witt O, Mönkemeyer S, Rönndahl G, Erdlenbruch B, Reinhardt D, Kanbach K, Pekrun A. (2003): Induction of fetal hemoglobin expression by the histone deacetylase inhibitor apicidin. *Blood* 101, 2001–2007

- Wu R, Lu Z, Cao Z, Zhang Y. (2011): Zinc chelation with hydroxamate in histone deacetylases modulated by water access to the linker binding channel. *J Am Chem Soc* 133, 6110–6113
- Wulf G, Garg P, Liou YC, Iglehart D, Lu KP. (2004): Modeling breast cancer in vivo and ex vivo reveals an essential role of Pin1 in tumorigenesis. *EMBO J* 23, 3397–3407
- Xu Y. (2003): Regulation of p53 responses by post-translational modifications. *Cell Death Differ* 10, 400–403
- Yamazaki T, Koo EH, Selkoe DJ. (1996): Trafficking of cell-surface amyloid beta-protein precursor. II. Endocytosis, recycling and lysosomal targeting detected by immunolocalization. *J Cell Sci* 109 (Pt 5), 999–1008
- Yang Y, Turner RS, Gaut JR. (1998): The Chaperone BiP/GRP78 Binds to Amyloid Precursor Protein and Decreases A $\beta$ 40 and A $\beta$ 42 Secretion. *J Biol Chem* 273, 25552–25555
- Yankner BA, Duffy LK, Kirschner DA. (1990): Neurotrophic and neurotoxic effects of amyloid beta protein: reversal by tachykinin neuropeptides. *Science* 250, 279–282
- Zheng H, Koo EH. (2006): The amyloid precursor protein: beyond amyloid. *Mol Neurodegener* 1, 5–5