

Aus der Abteilung Psychiatrie und Psychotherapie  
(Prof. Dr. med. P. Falkai)  
im Zentrum Psychosoziale Medizin  
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

---

**Die Funktionsanalyse und Pharmakomodulation des  
Amyloid-Vorläufer-Proteins (APP)  
*in vitro* und *in vivo***

Eine neue Zielstruktur zur Behandlung maligner Tumore

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

vorgelegt von

**Vivek Venkataramani**  
aus Hannover

Göttingen 2011

**Dekan:** Prof. Dr. med. C. Frömmel

**1. Berichterstatter:** Prof. Dr. rer. nat. T. Bayer

**2. Berichterstatter/in:**

**3. Berichterstatter/in:**

**Tag der mündlichen Prüfung:**

# Inhaltsverzeichnis

<b>1. Einleitung.....</b>	<b>1</b>
1.1 Die APP-Genfamilie.....	1
1.2 Struktur der APP/APLP-Proteine.....	1
1.3 Expression der APP/APLP-Proteine .....	4
1.4 Der Metabolismus und die Prozessierung des APP.....	4
1.4.1 Die Prozessierung des APP.....	4
1.4.2 Der amyloidogene Prozessierungsweg.....	5
1.4.3 Der nicht-amyloidogene Prozessierungsweg.....	6
1.4.4 Der Metabolismus des APP.....	7
1.4.5 Die biologische Funktion des APP.....	10
1.5 Bedeutung von Wachstumsfaktoren in der Tumorpathogenese.....	13
1.5.1 Pathogenese des kolorektalen Karzinoms.....	14
1.5.2 Pathogenese des Pankreaskarzinoms.....	16
1.5.3 Pathogenese der testikulären Keimzelltumore.....	17
1.6 Epigenetik .....	22
1.6.1 Die post-translationalen Modifikationen von Histonen.....	22
1.6.2 Der epigenetische Therapieansatz zur Behandlung von Tumoren.....	23
1.7 Zielsetzung und Fragestellungen.....	27
<b>2. Material und Methoden.....</b>	<b>29</b>
2.1 Chemikalien und Reagenzien.....	29
2.2 Biochemikalien und Enzyme.....	31
2.3 Gebrauchswaren.....	31
2.4 Ausstattung/Geräte.....	32
2.5 Software/Programme.....	34
2.6 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme.....	34
2.7 Lösungen/Puffer.....	35
2.8 Medien für eukaryontische Zellkulturen .....	37

2.9	Verwendete Zelllinien.....	38
2.9.1	Humane Karzinomzelllinien.....	38
2.9.2	Sonstige eukaryontische Zelllinien.....	41
2.9.3	Stabil transfizierte eukaryontische Zelllinien.....	41
2.10	Synthetische RNA-Oligonukleotide.....	42
2.11	Synthetische DNA-Oligonukleotide für quantitative <i>real-time</i> -PCR- Experimente.....	43
2.12	Verwendete primäre Antikörper für immunhistochemische Analysen.....	44
2.13	Verwendete primäre Antikörper für Western-Blot-Analysen.....	45
2.13.1	Charakterisierung der APP-Antikörper durch Western-Blot-Analysen ....	46
2.14	Verwendete sekundäre Antikörper für Immunhistochemie und Western-Blot- Analysen.....	47
2.15	Molekularbiologische Methoden.....	48
2.15.1	Isolierung, Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Ribonukleinsäure (RNA) aus Zellkulturen.....	48
2.15.2	Reverse Transkription (RT).....	49
2.15.3	Quantitative real-time (RT) PCR-Analysen.....	49
2.15.4	Microarray-Analysen.....	51
2.15.5	Proteinbiochemische Techniken.....	52
2.15.5.1	Isolierung von Gesamt-Protein aus Zellkulturen .....	52
2.15.5.2	Isolierung von Gesamt-Protein aus implantierten Xenograft- Tumoren.....	52
2.15.5.3	Konzentrationsbestimmung von Proteinen.....	53
2.15.5.4	Western Blot.....	54
2.15.5.5	SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page).....	54
2.15.5.6	Western-Blot-Analysen von Proteinen auf Nitrozellulose- Membranen.....	55
2.15.5.7	Detektion der Proteine .....	56
2.15.5.8	<i>Strippen</i> der Nitrozellulose-Membran.....	56
2.15.5.9	Metabolische Markierung von Zellen/ <i>Pulse-Chase</i> - Experimente.....	57
2.16	Zellbiologische Methoden.....	57
2.16.1	Kultivierung eukaryontischer Zellen.....	57

2.16.2	Kryokonservierung und Revitalisierung eukaryontischer Zellen.....	58
2.16.3	Zellzahlbestimmung.....	58
2.16.4	Bestimmung der sAPP $\alpha$ -Konzentration im Kulturmedium.....	58
2.16.5	Proliferationsassay.....	59
2.16.6	LDH-Messung mittels Zytotoxizitätsassay.....	60
2.16.7	Indirekte Immunfluoreszenz.....	61
2.16.8	Herunterregulation der Genregulation mittels RNA-Interferenz (RNAi).....	62
2.16.9	Transfektion eukaryontischer Zellen mit siRNA.....	63
2.17	Tierexperimentelle Methoden.....	64
2.18	Patientenmaterial.....	65
2.18.1	Pankreas- und Kolonkarzinome.....	65
2.18.2	Testikuläre Keimzelltumore.....	65
2.18.3	Histologische Techniken.....	66
2.18.3.1	Fixierung des Gewebes.....	67
2.18.3.2	Herstellung der Paraffinschnitte.....	67
2.18.3.3	Herstellung der Tissue Microarrays (TMA).....	67
2.18.3.4	Immunhistochemie in Paraffingewebeschnitten.....	68
2.18.3.5	Semi-Quantifizierung durch den immunreaktiven Score.....	69
2.19	Statistische Analysen.....	70

### **3. Ergebnisse..... 71**

3.1	Projekt I: Die Regulation des Amyloid-Vorläufer-Proteins (APP) durch den HDAC-Inhibitor VPA führt zur Inhibition des Tumorwachstums .....	71
3.1.1	Einfluss der APP-Expression auf das Zellwachstum <i>in vitro</i> .....	71
3.1.2	Die N-terminale Domäne des APP ist essentiell für die wachstumsfördernde Funktion.....	74
3.1.3	Identifizierung der differentiellen APP-Expression im Kolon- und Pankreaskarzinom.....	76
3.1.4	Expression und Prozessierung vom APP in etablierten Kolon- und Pankreaskarzinomzelllinien.....	78

3.1.5	Herunterregulierung der APP-Expression in Kolon- und Pankreaskarzinomzelllinien mittels RNA-Interferenz.....	79
3.1.6	Inhibition des Tumorwachstums und Reduktion des APP und seiner sekretierten Prozessierungsprodukte durch Valproat.....	82
3.1.7	Inhibition der korrekten Reifung des APP durch Valproat.....	85
3.1.8	Spezifische Reduktion der APP-Proteinexpression durch Valproat.....	86
3.1.9	Die Inhibition von Histondeacetylasen führt zu einer spezifischen Modulation des APP-Metabolismus.....	88
3.1.10	Einfluss der Histondeacetylase-Inhibition auf die GRP78/BiP Expression.....	90
3.1.11	Validation der Histondeacetylase-abhängigen APP-Modulation in weiteren Pankreas- und Kolonkarzinomzelllinien.....	92
3.1.12	Antagonisierung des HDAC-induzierten Wachstumsarrests durch sekretiertes APP.....	95
3.2	Projekt II: Das Amyloid-Vorläufer-Protein (APP) als Biomarker für transformierte, pluripotente Keimzelltumore.....	96
3.2.1	Korrelation der APP-Expression mit der Stammzellsignatur in pluripotenten Keimzelltumoren.....	96
3.2.2	Expression und spezifische Modulation von Klasse-I-Histondeacetylasen in pluripotenten Keimzelltumoren.....	98
3.2.3	Histondeacetylase-abhängige Induktion einer Differenzierung in pluripotenten Keimzelltumoren.....	101
3.2.4	Inhibition von Histondeacetylasen führt zur gleichzeitigen Modulation von APP und der Stammzellsignatur.....	103
3.2.5	Immunzytochemische Analysen und morphologische Veränderungen nach Inhibition von Histondeacetylasen.....	106
3.2.6	Die inverse Beziehung zwischen APP-und GRP78-Expression <i>in vivo</i> und <i>in vitro</i> .....	107
3.2.7	In-vivo-Therapiestudie: Applikation von Valproat zur Behandlung	

von NTera-2-Xenograft-Mäusen.....	111
3.2.8 Immunhistochemische Analyse der APP-Expression im Xenograft-Modell.....	114
3.2.9 Revertierung der HDAC-induzierten Differenzierung durch sekretiertes APP in Keimzelltumoren <i>in vitro</i> .....	116
<b>4. Diskussion.....</b>	<b>117</b>
4.1 Die physiologischen und pathophysiologischen Funktionen des APP.....	117
4.1.1 Die physiologische Funktion des APP als potenter Wachstumsfaktor.....	118
4.1.2 Einfluss des APP auf die Biologie maligner Tumoren.....	119
4.2 Inhibition von Histondeacetylasen als Therapieansatz maligner Tumore.....	122
4.2.1 Modulation des APP-Metabolismus durch Histondeacetylase-Inhibitoren..	122
4.2.2 Modell für den Wirkmechanismus von VPA auf den APP-Metabolismus...	124
4.3 Die biologische Relevanz des APP in transformierten, pluripotenten Stammzellen.....	126
4.3.1 Histondeacetylase-Inhibitoren als potente Induktoren der Differenzierung...	129
4.3.2 Revertierung der Differenzierung durch sekretiertes sAPP.....	132
4.3.3 Histondeacetylase-Inhibitoren reduzieren APP <i>in vivo</i> .....	133
4.4.4 Schlussfolgerungen.....	134
<b>5. Zusammenfassung.....</b>	<b>137</b>
<b>6. Anhang.....</b>	<b>139</b>
6.1 Charakterisierung der APP-Antikörper durch Western-Blot-Analysen.....	139
6.2 Analyse der APP-Expression in Prostata-, Glioblastom- und cholangiozellulären Karzinom-Linien.....	140
6.3 Analyse der APLP2-Expression nach APP-siRNA-Behandlung.....	141
6.4 Zytotoxizitätsbestimmung nach VPA-Behandlung.....	141
6.5 sAPP $\alpha$ und sAPP-Gesamt nach VPA-Behandlung.....	142

<b>7. Literatur.....</b>	<b>143</b>
<b>8. Veröffentlichungen.....</b>	<b>168</b>

# Abbildungsverzeichnis

Abb. 1.1	Die APP-Genfamilie.....	Seite 3
Abb. 1.2	Schematische Darstellung der proteolytischen Prozessierung des APP.	Seite 7
Abb. 1.3	Schematische Darstellung des intrazellulären APP-Metabolismus.....	Seite 9
Abb. 1.4	Die Ähnlichkeiten zwischen der Embryonalentwicklung und der Keimzell-Tumorigenese.....	Seite 20
Abb. 1.5	Modulation der Gentranskription durch epigenetische Modifikationen.....	Seite 23
Abb. 2.1	Proteinkonzentrationsbestimmung durch den Biuret-Assay mit BCA...	Seite 53
Abb. 2.2	Bestimmung der Proliferation mit dem Cell Titer 96 <sup>®</sup> -A <sub>QUEOUS</sub> -Non-Radioactive-Cell-Proliferationassay.....	Seite 59
Abb. 2.3	Übersicht über den Mechanismus der RNA-Interferenz (RNAi).....	Seite 63
Abb. 3.1	Einfluss des APP auf die Zellproliferation.....	Seite 73
Abb. 3.2	Die N-terminale Domäne ist essentiell für die wachstumsfördernde Funktion von APP.....	Seite 75
Abb. 3.3	Die immunhistochemische Analyse der APP-Expression in gastrointerstinalen Tumoren.....	Seite 77
Abb. 3.4	Expression von APP und seinen Prozessierungsprodukten in etablierten Kolon- und Pankreaskarzinomzelllinien.....	Seite 79
Abb. 3.5	Herunterregulation der APP-Expression durch RNA-Interferenz inhibierte das Tumorwachstum.....	Seite 81
Abb. 3.6	Inhibition des Tumorwachstums und Reduktion des APP und seiner sekretierten Prozessierungsprodukte durch VPA.....	Seite 84
Abb. 3.7	Inhibition der korrekten Reifung des APP durch Valproat.....	Seite 86
Abb. 3.8	Spezifische Reduktion der APP-Proteinexpression durch Valproat.....	Seite 88
Abb. 3.9	Die Inhibition von Histondeacetylasen führt zu einer spezifischen Modulation des APP-Metabolismus.....	Seite 90
Abb. 3.10	Einfluss der Histondeacetylase-Inhibition auf die GRP78/BiP-Expression.....	Seite 92

Abb. 3.11	Validation der HDAC-abhängigen APP-Modulation in weiteren Pankreas- und Kolonkarzinomzelllinien.....	Seite 94
Abb. 3.12	Sekretiertes APP antagonisiert Valproat- induzierten Wachstumsarrest	Seite 95
Abb. 3.13	Korrelation der APP-Expression mit der Stammzellsignatur.....	Seite 97
Abb. 3.14	Expression und spezifische Modulation von Histondeacetylase-Enzymen in pluripotenten Keimzelltumoren.....	Seite 100
Abb. 3.15	HDAC-abhängige Induktion einer Differenzierung in pluripotenten Keimzelltumoren.....	Seite 102
Abb. 3.16	Inhibition von Histondeacetylasen führt zur gleichzeitigen Modulation von APP und der Stammzellsignatur.....	Seite 105
Abb. 3.17	Immunzytochemische Analysen und morphologische Veränderungen nach VPA und Apicidin-Behandlung.....	Seite 107
Abb. 3.18	Induktion von GRP78 in differenzierten Subtypen testikulärer Tumore	Seite 108
Abb. 3.19	Inverse Beziehung zwischen APP und GRP78 in vitro.....	Seite 110
Abb. 3.20	Behandlung von NTera-2-Xenograft-Mäusen mit VPA.....	Seite 113
Abb. 3.21	Immunhistochemische Analyse der APP-Expression im Xenograft-Modell.....	Seite 115
Abb. 3.22	Revertierung der HDAC-induzierten Differenzierung durch sAPP $\alpha$ .....	Seite 116
Abb. 4.1	Schematische Darstellung des postulierten Mechanismus.....	Seite 126
Abb. 6.1	Die Charakterisierung von APP-Antikörpern im Western Blot.....	Seite 139
Abb. 6.2	Analyse der APP-Expression in Prostata-, Glioblastom-, und cholangiozellulären Karzinom-Linien.....	Seite 140
Abb. 6.3	Analyse der APLP2-Expression nach APP-siRNA-Behandlung.....	Seite 141
Abb. 6.4	Zytotoxizität von VPA.....	Seite 141
Abb. 6.5	sAPP $\alpha$ und sAPP-Gesamt nach VPA-Behandlung.....	Seite 142

# Abkürzungsverzeichnis

A $\beta$	Amyloid-beta
Abb.	Abbildung
Abt.	Abteilung
APLP1	<i>Amyloid precursor-like protein 1</i>
APLP2	<i>Amyloid precursor-like protein 2</i>
APP	<i>Amyloid precursor protein</i> , Amlyoid-Vorläufer-Protein
bp	Basenpaare
BSA	Rinderserumalbumin
°C	Celsius
CC	Chorionkarzinom
cDNA	<i>complementary DNA</i> , komplementäre Desoxyribonukleinsäure (DNA)
DAB	3,3'-Diaminobenzidin
DAPI	4',6-Diamidin-2-phenylindol
EC	Embryonales Karzinom
ELISA	<i>Enzyme-Linked Immunosorbent Assay</i>
ER	Endoplasmatische Retikulum
g	<i>g-Force</i> , Erdbeschleunigung
GmbH	Gesellschaft mit beschränkter Haftung
h	Stunde
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondeacetylase
HRP	<i>Horseradish Peroxidase</i> , Meerrettichperoxidase
Ig	Immunglobulin
Inc.	<i>Incorporated</i>
kDa	Kilodalton
KG	Körpergewicht
kg	Kilogramm
LDH	Laktatdehydrogenase
M	Mol
m	Milli

## Abkürzungsverzeichnis

μ	Mikro
MAPK	<i>Mitogen-activated protein kinase</i>
MEM	<i>Minimum Essential Medium</i>
mg	Milligramm
min	Minute
MTS	3-(4,5-Dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide
n	Nano
ng	Nanogramm
PAGE	Polyacrylamidgelelektrophorese
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> , Phosphatgepufferte Salzlösung
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
pH	<i>pondus hydrogenii</i>
®	<i>Registered in U.S. Patent and Trademark Office</i>
RIP	regulierte Proteolyse innerhalb der Membran
RNAi	RNA-Interferenz
rpm	<i>revolutions per minute</i> , Umdrehungen pro Minute
SE	Seminom
sec	Sekunde
SEM	<i>standard error of the mean</i> , Durchschnittsfehler der Standardabweichung
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
Tab.	Tabelle
TE	Teratom
TMA	Tissue-Microarray
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan
TSA	Trichostatin A
UMG	Universitätsmedizin Göttingen
V	Volt
v/w	Volumen pro Gewicht
VPA	Valproat
VPM	Valpromid
YST	Yolk-Sac-Tumor, Dottersacktumor

# 1. Einleitung

## 1.1 Die APP-Genfamilie

Das Amyloid-Vorläufer-Protein (*amyloid precursor protein*, APP) ist eines der wichtigsten Proteine, das bei der Pathogenese der Alzheimer-Krankheit eine Rolle spielt. Dieses Protein ist evolutionär hoch-konserviert und ist Mitglied einer Gen-Superfamilie, zu der insgesamt 17 Gene zugeordnet werden können (Coulson et al., 2000; Collin et al., 2004). Weitere Mitglieder sind unter anderem die APP-homologen Gene APLP1 (*amyloid precursor-like protein 1*) und APLP2 (*amyloid precursor-like protein 2*) sowie die homologen Gene APPL aus *Drosophila melanogaster* und APL-1 aus *Caenorhabditis elegans*. Von der Perspektive der Evolution aus gesehen sind die Gene APPL und APL-1 vermutlich aus einer separaten Linie als Vorläufer des APP entstanden. Die Linie der humanen APP-Gen-Familie entwickelte sich wahrscheinlich durch zwei Genduplikationen. Die erste Duplikation führte zu den Linien APP und preAPLP (APLP2). Das APLP1 spaltete sich später in einer zweiten Genduplikation vom APLP2 ab (Coulson et al., 2000). Hierdurch kann man auch die Tatsache begründen, dass APP zu APLP2 eine stärkere Homologie aufweist als zu APLP1 (Abb. 1.1 A). Analysen der UWGCG (*University of Wisconsin Genetic Computer Group*) ermittelten, dass die Aminosäuren in humanem APLP2 (APLP2763 Isoform) verglichen mit APP (APP751 Isoform) zu 68% identisch sind (Walsh et al., 2007).

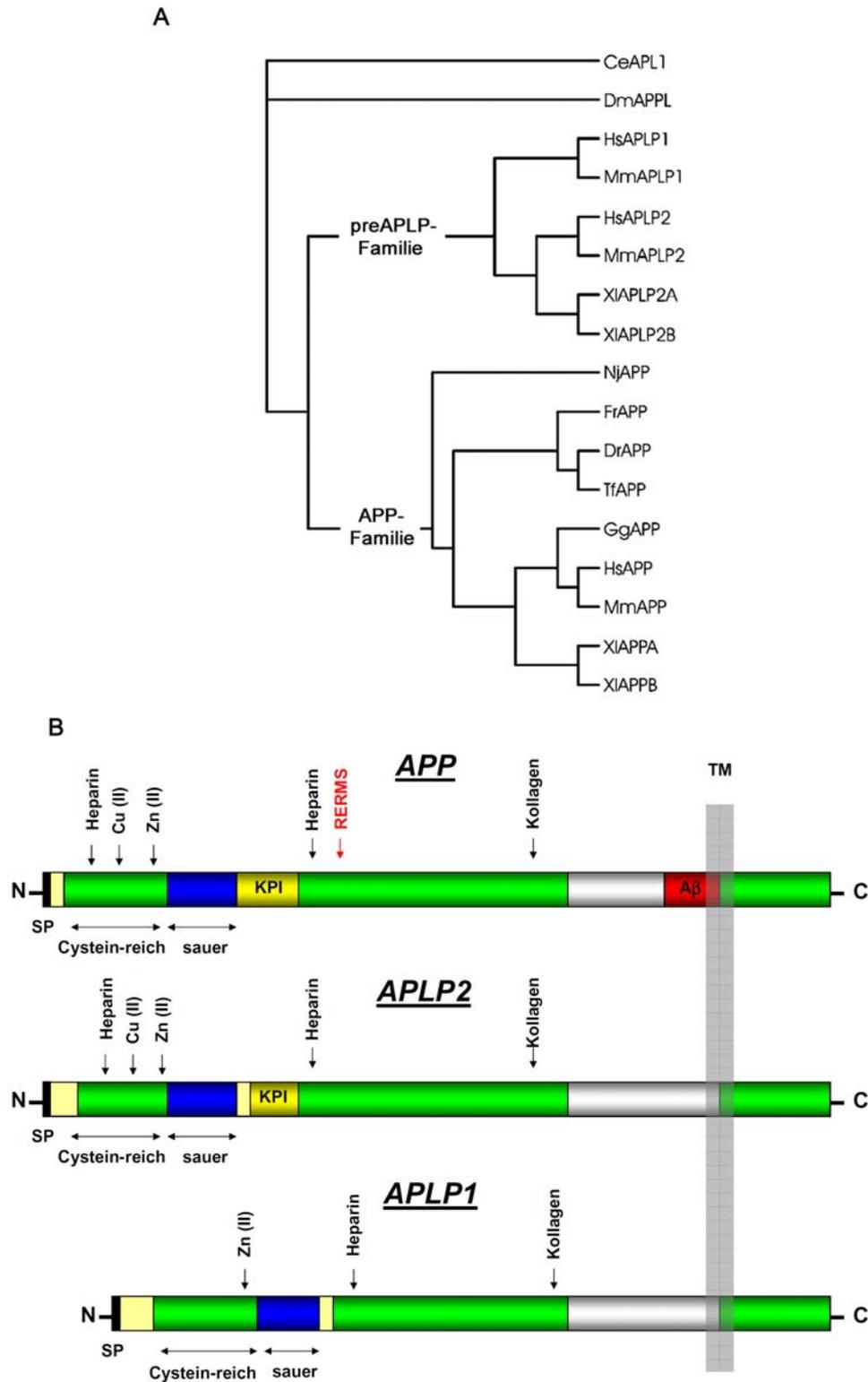
## 1.2 Struktur der APP/APLP-Proteine

Wie bereits erwähnt, zeigen die Proteine der APP-Superfamilie einen hohen Grad der Konservierung bezüglich der Aminosäuresequenz auf. Alle drei Genprodukte kodieren für ein Typ-I-Transmembranglykoprotein mit einer großen extrazellulären N-terminalen Domäne, einer Transmembrandomäne und einem kurzen zytoplasmatischen Teil (C-Terminus) (Kang et al., 1987; Sprecher et al., 1993; Wasco et al., 1993b). Auffällig ist dabei, dass sowohl der extrazelluläre als auch der C-terminale Bereich stark konserviert sind, während der Teil der Transmembrandomäne, der bei APP die A $\beta$ -Sequenz enthält, in keinem der anderen beiden APLPs Homologien aufweist (Bayer et al., 1999; Reinhard et al., 2005).

Die extrazelluläre Domäne des APP besteht aus einem Signalpeptid (SP), einer cysteinreichen Domäne, sauren Domänen mit Zink- und Kupferbindungsstellen, einer Proteaseinhibitor-Domäne (*kunitz type protease inhibitor domain*, KPI) sowie aus einer Ox-2- und Kohlenhydrat-Domänen. Das 17 Aminosäure lange SP wird nach Eintritt in das endoplasmatische Retikulum (ER) abgespalten.

An diesen extrazellulären Teil schließt sich die Transmembrandomäne, die mit der APP-spezifischen A $\beta$ -Sequenz beginnt. Im Zellinneren befindet sich die C-terminale Domäne, die mit diversen Interaktionspartnern (wie Fe65, JIP1, Shc, Dab, Mint1) agiert. Viele dieser Domänen gleichen sich auch in den APLP, während die Ox2- und vor allem die A $\beta$ -Domäne vollständig fehlen.

Die extrazellulären Domänen von APP und APLP2 enthalten zwei Heparin-Bindedomänen, je eine Zink- und eine Kupfer-Bindedomäne, eine KPI-Domäne sowie eine Kollagen-Bindedomäne. In der extrazellulären Domäne des APLP1 konnten eine Zink-Bindedomäne sowie eine C-terminal gelegene Heparin-Bindedomäne identifiziert werden. Spezifisch für das APP konnte in der N-terminalen Domäne ein RERMS-Motiv gefunden werden (Abb. 1.1 B). *In-vitro*-Experimente zeigten, dass eine Behandlung mit RERMS-Peptiden sowohl zu einem positiven Effekt auf die Proliferation als auch auf das Neuritenwachstum führte (Ninomiya et al., 1993; Jin et al., 1994). Anhand von Röntgenkristall-Analysen der N-terminalen Heparin-Bindedomäne des APP konnte eine Ähnlichkeit zu cysteinreichen Wachstumsfaktoren festgestellt werden. Die bereits erwähnte A $\beta$ -Sequenz wird von einer Region kodiert, die im C-terminalen Bereich und teilweise im Transmembranen-Anteil liegt. Diese ist essentiell in der pathophysiologischen Kaskade der Alzheimer-Krankheit involviert.



**Abb. 1.1: Die APP-Genfamilie.** (A) Der Stammbaum zeigt die frühe Auftrennung in eine APP- und in eine pre-APLP-Familie, aus der dann APLP1 und APLP2 folgten. Ce, *Caenorhabditis elegans* (Fadenwurm); Dm, *Drosophila melanogaster* (Taufliege); Dr, *Danio rerio* (Zebrafisch); Fr, *Fugu rubripes* (Kugelfisch); Gg, *Gallus gallus* (Haushuhn); Hs, *Homo sapiens* (Mensch); Mm, *Mus musculus* (Hausmaus); Nj, *Narke japonica* (Zitterrochen); Tf, *Tetraodon fluviatilis* (Grüner Flusskugelfisch); Xl, *Xenopus laevis* (Krallenfrosch). Modifiziert nach Collin et al. 2004, S. 1909. (B) Schematische Darstellung der drei Mitglieder der humanen APP-Genfamilie (APP770, APLP2 763). Grün unterlegte Bereiche weisen einen hohen Grad der Homologie auf. In Rot hervorgehoben ist die A $\beta$ -Domäne. SP, Signalpeptid; KPI, Kunitz-Protease-Inhibitor-Domäne, Cu(II), Kupfer-Bindungsstelle; Zn(II), Zink-Bindungsstelle; TM, Transmembrandomäne.

### **1.3 Expression der APP/APLP-Proteine**

Das auf dem Chromosom 21 lokalisierte humane APP-Gen besteht aus insgesamt 18 Exonen, von denen die Exone 7, 8 und 15 alternativ gespleißt werden können. Die mindestens acht existierenden Spleißvarianten (APP677, APP695, APP696, APP714, APP733, APP751, APP752 and APP770) werden während der Entwicklung als auch in verschiedenen Zelltypen unterschiedlich stark exprimiert (Golde et al., 1990; Sandbrink et al., 1997). Dabei konnte nachgewiesen werden, dass APP695 (neuronale Isoform) hauptsächlich in Nervenzellen vorkommt, während APP751 und APP770 (nicht-neuronale Isoformen) die prädominanten Formen in Glia- und peripheren Zellen darstellen. Im Gegensatz zu den nicht-neuronalen Isoformen, enthält die neuronale 695-Isoform weder eine KPI-, noch eine Ox-2-Domäne.

Das auf dem Chromosom 11 lokalisierte APLP2 wird ähnlich wie das APP ubiquitär exprimiert (Jacobsen & Iverfeldt, 2009). APLP2-Spleißvarianten entstehen durch alternatives Spleißen der Exone 7 und 14. Im Gegensatz zu APP werden besonders im Gehirn APLP2-Isoformen exprimiert, die eine KPI-Domäne enthalten (Sandbrink et al., 1994).

Das APLP1-Gen, was auf dem Chromosom 19 liegt, beinhaltet weder eine KPI- noch eine Kupfer-Bindungsdomäne (Simons et al., 2002). Im Gegensatz zu APP und APLP2 unterliegt das APLP1 keinem alternativen Spleißen (Wasco et al., 1993a; Walsh et al., 2007). Interessanterweise kann sowohl in Nerven- als auch in Gliazellen das APLP1 nachgewiesen werden. Eine Expression in nicht-neuronalen Zellen hingegen findet nicht statt (Bayer et al., 1997).

Für alle drei Familienmitglieder ist nachgewiesen worden, dass sie post-translational modifiziert über einen konstitutiven sekretorischen Weg an die Plasmamembran gelangen (Weidemann et al., 1989; Buxbaum et al., 1990; Sisodia et al., 1996; Eggert et al., 2004).

### **1.4 Der Metabolismus und die Prozessierung des APP**

#### **1.4.1 Die Prozessierung des APP**

Die APP-Prozessierung trägt einen entscheidenden Teil zur Pathogenese der Alzheimer-Krankheit bei. Das APP ist ein integrales Membranprotein, das auf zwei alternativen Wegen proteolytisch durch die so genannten Sekretasen gespalten werden kann: der amyloidogene

Weg, der zur Entstehung der A $\beta$ -Peptide führt, sowie der anti-amyloidogene Weg, bei dem sAPP $\alpha$  entsteht und die Generierung von A $\beta$ -Peptiden verhindert wird (Abb. 1.2).

### 1.4.2 Der amyloidogene Prozessierungsweg

Bei der amyloidogenen Prozessierung des APP wird in einem ersten Schritt von der Aspartat-Protease BACE1 ( $\beta$ -Sekretase, *beta-site APP cleaving enzyme 1*) innerhalb der extrazellulären Domäne am N-Terminus der A $\beta$ -Sequenz geschnitten. Dabei wird die lösliche N-terminale Ektodomäne, die als sAPP $\beta$  bezeichnet wird, abgespalten und in den Extrazellulärraum abgegeben (Vassar et al., 1999). Dieser Prozess wird auch als *ectodomain shedding* bezeichnet. Gleichzeitig wird der membranverankerte Rest, der aus 99 Aminosäuren (C99 oder  *$\beta$ -stub*) besteht, durch den  $\gamma$ -Sekretase-Komplex weiter gespalten, was auch als *regulated intramembrane proteolysis* (RIP) bezeichnet wird (Brown et al., 2000; Annaert & De Strooper, 2002). Der  $\gamma$ -Sekretase-Komplex, der auch als Proteasom der Zellmembran bezeichnet wird, setzt sich aus vier Transmembranproteinen zusammen, PS1 oder PS2 (*presenilin 1 und 2*), Nicastrin, Aph-1 (*anterior pharynx defective-1*) und PEN-2 (*presenilin enhancer protein*) (Ehehalt et al., 2003; Wada et al., 2003; Kopan & Ilagan, 2004). Dadurch wird das 4 kDa große A $\beta$ -Peptid generiert, welches eine Länge von 34 bis 42 Aminosäuren hat (Thinakaran & Koo, 2008). Ebenfalls entsteht durch diesen Prozess die APP-intrazelluläre Domäne (*APP intracellular domain, AICD*). *In vitro* konnte nachgewiesen werden, dass AICD mit anderen Interaktionsproteinen, wie Fe65 oder der Histon-Acetyltransferase Tip60, komplexieren und in den Nukleus translozieren kann. Dort wird vermutet, dass AICD an der Modulation von diversen Transkriptionsfaktoren beteiligt ist (Cao & Sudhof, 2004). Nachfolgende Studien konnten belegen, dass AICD tatsächlich im Zellkern von primären Neuronen nachgewiesen werden kann. Bedingt durch die sehr kurze Halbwertszeit der AICD konnte jedoch bislang kein Nachweis in humanem Gewebe erbracht werden (Cupers et al., 2001). Das A $\beta$ -Peptid wird extrazellulär sezerniert und ist in der Lage, sich zu Oligomeren zusammenzuschließen (Walsh et al., 2005). Diese können so genannte Protofibrillen ausbilden, aus denen am Ende die charakteristischen Amyloid-Plaques entstehen (Selkoe, 2001; Haass & Steiner, 2002).

### 1.4.3 Der nicht-amyloidogene Prozessierungsweg

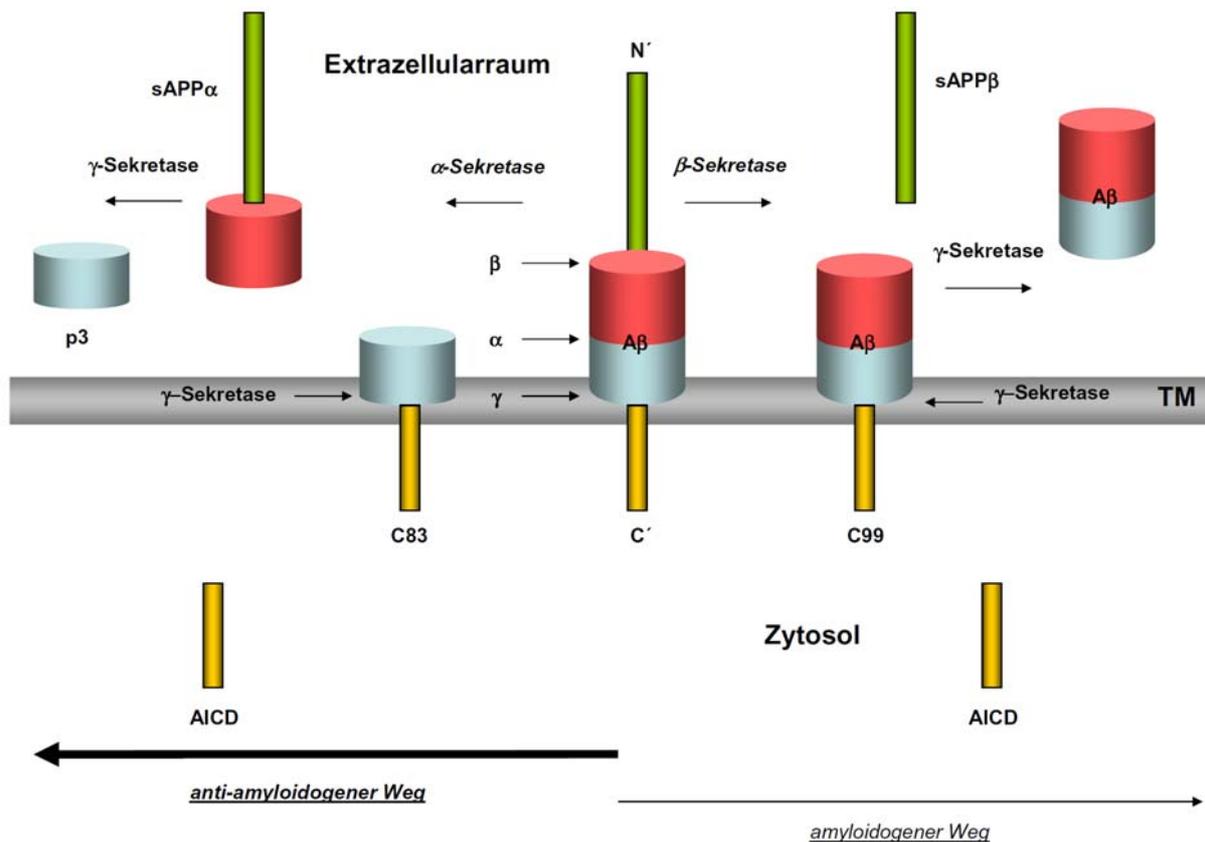
Bei der anti-amyloidogenen APP-Prozessierung spielen Metalloproteasen eine zentrale Rolle. Unter physiologischen Konditionen verlaufen 90% der APP-Prozessierung über diesen Prozessierungsweg. Die so genannte  $\alpha$ -Sekretase spaltet das APP zwischen Aminosäure 16 und 17 (Lysin<sub>16</sub> – Leucin<sub>17</sub>) innerhalb der A $\beta$ -Region, so dass ein großes lösliches Fragment, das sAPP $\alpha$  in den Extrazellularraum freigesetzt wird (Anderson et al., 1991; Sisodia, 1992; Kojro & Fahrenholz, 2005). Der in der Membran verbleibende Rest, der membranständige C-Terminus (C83), wird durch den  $\gamma$ -Sekretase-Komplex zu den Fragmenten p3<sub>40</sub>, p3<sub>42</sub> und AICD weiter prozessiert (Haass et al., 1993; Hartmann, 1999). Im Gegensatz zum A $\beta$ -Peptid spielen die p3-Peptide keine Rolle bei der Pathogenese der Alzheimer-Krankheit.

Als mögliche  $\alpha$ -Sekretasen sind ADAM9, ADAM10 und auch TACE (ADAM17) beschrieben worden (*a disintegrin and metalloproteinase, tumor necrosis factor- $\alpha$  converting enzyme*). Eine Überexpression von ADAM9 konnte in COS-Zellen zu einer vermehrten sAPP $\alpha$ -Produktion führen. Gleichzeitig konnte aber auch festgestellt werden, dass rekombinantes APP-Peptid nicht durch ADAM9 an der  $\alpha$ -Sekretase-Spaltstelle prozessiert wird (Roghani et al., 1999). In Übereinstimmung zeigten ADAM9-*knock-out*-Mäuse weder eine Abnahme der APP-Prozessierung noch einen auffälligen Phänotyp (Weskamp et al., 2002). Hingegen konnte für ADAM10 sowohl eine konstitutive als auch eine regulierte  $\alpha$ -Sekretase-Aktivität nachgewiesen werden. Eine stabile Überexpression dieser Protease war mit erhöhten sAPP $\alpha$ -Spiegeln verbunden, während die dominant-negative Variante mit einer Mutation im Zinkbindungsmotiv (katalytisches Zentrum) zu einer deutlichen Erniedrigung der  $\alpha$ -Sekretase-Aktivität führte (Lammich et al., 1999). In einer aktuellen Studie konnte zumindest in primären Neuronen die ADAM10 als prädominante Sekretase identifiziert werden. Hier zeigten die Autoren, dass nur durch einen gezielten genetischen *knock-down* der ADAM10-Expression signifikant die sAPP $\alpha$ -Produktion abnahm (Kuhn et al., 2010). Zudem konnte in ADAM10-transgenen Mäusen eine verstärkte Aktivität der  $\alpha$ -Sekretase und eine signifikante Abnahme der Amyloid-Plaques bestätigt werden (Postina et al., 2004).

Im Gegensatz zum neurotoxischen A $\beta$ -Peptid zeigt das  $\alpha$ -Sekretase-Spaltprodukt sAPP $\alpha$  wachstumssteigernde und neuroprotektive Eigenschaften (Postina, 2008). Es konnte gezeigt werden, dass rekombinantes sAPP $\alpha$  äußerst potent die Proliferation von Fibroblasten steigert (Saitoh et al., 1989). *In vivo* konnte nachgewiesen werden, dass die intraventrikuläre

Applikation von sAPP $\alpha$  nicht nur die Synaptogenese, sondern auch deutlich die Erinnerungsleistung von Wildtyp-Ratten förderte (Roch et al., 1994).

Durch diese Beobachtungen wird vermutet, dass der anti-amyloidogene Weg der APP-Prozessierung der Entwicklung der Alzheimer-Krankheit entgegenwirkt (Saitoh & Mook-Jung, 1999).



**Abb. 1.2: Schematische Darstellung der proteolytischen Prozessierung des APP.** Dargestellt sind der amyloidogene und der anti-amyloidogene Prozessierungsweg. Eingezeichnet sind die Schnittstellen von  $\alpha$  (alpha-Sekretase),  $\beta$  (beta-Sekretase) und der  $\gamma$  (gamma-Sekretase). Die Abbildung ist modifiziert nach Haass & Steiner, 2002 (S. 557).

#### 1.4.4 Der Metabolismus des APP

Ähnlich wie andere Typ-I-Transmembranproteine wird das APP kotranslational in das ER transloziert und dort entlang des sekretorischen Weges in den Golgi-Apparat transportiert. Nach der Reifung im ER und Golgi-Apparat wird das APP mittels Vesikeln zur Plasmamembran weitertransportiert, wo ein Großteil des APP durch die  $\alpha$ -Sekretase weiter

prozessiert wird (Sisodia, 1992). Wenn eine Prozessierung nicht stattfindet, kann das APP zusätzliche Wege, auch *recycling pathways* genannt, beschreiten und retrograd von der Membran zum *trans*-Golgi-Netzwerk sowie in die Lysosomen, wo eine Degradation stattfindet, transportiert werden (Vetrivel & Thinakaran, 2006; Thinakaran & Koo, 2008). So gelangt das APP ebenfalls über endosomalen Transport in verschiedene Kompartimente und konnte bereits in Mitochondrien nachgewiesen werden (Anandatheerthavarada et al., 2003).

Während das APP das ER und den Golgi-Apparat durchwandert, wird dieses Protein post-translational modifiziert. Zu diesen Modifikationen zählt neben einer N- und O-Glykosylierung auch eine Sulfatierung von Tyrosinresten (Weidemann et al, 1989; Oltersdorf et al., 1990; Suzuki et al., 1994). Abhängig vom Zelltyp wird mindestens eine der beiden Glykosylierungsstellen (Asn<sub>467</sub> und Asn<sub>496</sub> der APP695-Isoform) immer modifiziert. Insbesondere die O-Glykosylierung des APP spielt eine wichtige Rolle beim subzellulären Transport zur Plasmamembran. Es konnte gezeigt werden, dass nur nach einer O-Glykosylierung auch ein korrekter Weitertransport und die Prozessierung an der Plasmamembran stattfinden konnte (Tomita et al., 1998).

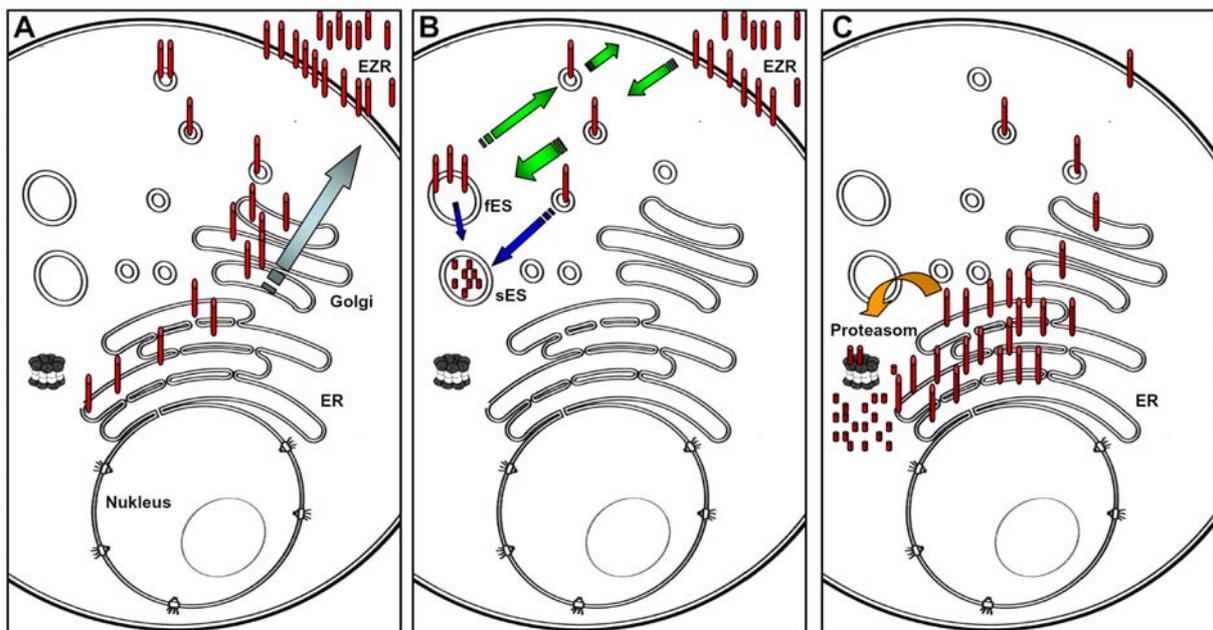
Unter physiologischen Bedingungen wird das APP meist über das endosomal/lysosomale System aufgenommen und dort abgebaut. Wird das APP hingegen fehl-glykosyliert, unterglykosyliert oder im ER durch Interaktionsproteine festgehalten, findet eine ER-assoziierte Proteindegredation (ERAD, *ER-associated protein degradation*) durch das Proteasom statt (Bunnell et al., 1998; Hare, 2001). Folgende Interaktionsproteine sind beschrieben, die direkt mit dem APP interagieren und eine Degradation vermitteln können: Das ER-Chaperon GRP78/BiP (*78 kDa glucose regulated protein/ binding immunoglobulin protein*), die ERAD-assoziierte ER-ubiquitin-protein-ligase HRD1 (*HMG-CoA reductase degradation protein-1*), die mitochondriale stress-responsive Serinprotease HtrA2 (*high temperature requirement A2*) und MOCA (*modifier of cell adhesion* oder auch Dock3 genannt).

Bereits 1998 konnte GRP78 als selektiver APP-Bindungspartner identifiziert werden. Yang et al. (1998) konnten zeigen, dass eine Überexpression von GRP78 zu einer Inhibition der APP-Maturation (Reifung) und Sekretion führte (Yang et al., 1998). Der genaue Mechanismus des APP-Abbaus ist aber nach wie vor nicht vollständig geklärt. Allerdings konnte für andere Bindungspartner von GRP78 (wie z.B. das Apolipoprotein B100) gezeigt werden, dass nach Induktion von GRP78 eine proteasomale Degradation des Zielproteins durch das ERAD-System vermittelt wird (Qiu et al., 2005). Ebenfalls konnte in einer aktuellen Studie gezeigt werden, dass durch eine Überexpression der ERAD-assoziierten ER-ubiquitin-protein-ligase HRD1 APP ubiquitin-abhängig durch das Proteasom abgebaut wird (Kaneko et al., 2010). In

diesem Zusammenhang ist es wichtig anzumerken, dass GRP78 als auch HRD1 essentielle Komponenten des ERAD-Systems darstellen. Beide Faktoren können zusammen interagieren und diverse Substrate über das Ubiquitin/Proteasom-System abbauen (Tamura et al., 2008).

Für die Serinprotease HtrA2 ist bekannt, dass nach der Bindung an APP eine Retrotranslokation ins Zytosol und anschließend eine proteasomale Degradation des APP stattfindet (Huttunen et al., 2007). Ähnlich hierzu führt auch eine Überexpression von MOCA (*modifier of cell adhesion* oder auch Dock3 genannt) zu einer APP-Degradation, die durch parallele Addition von Proteasom-Inhibitoren antagonisiert werden kann (Schubert et al., 1989).

Der Transport des APP und vor allem die Interaktion mit verschiedenen Bindungspartnern spielen eine große Rolle für dessen Prozessierung. Die Modulation des subzellulären Transports hat dementsprechend tragende Konsequenzen für die biologische Wirksamkeit des APP. Die Abbildung 1.3. zeigt eine Darstellung des APP-Metabolismus.



**Abb. 1.3: Schematische Darstellung des intrazellulären APP-Metabolismus.** (A) Nach der post-translationalen Modifikation im ER und Golgi-Netzwerk wird das APP (rote Balken) mittels sekretorischer Vesikel an die Plasmamembran transportiert (hellblaue Pfeile) und weiter durch Sekretasen (nicht eingezeichnet) prozessiert. (B) Alternativ hierzu kann das membran-ständige APP wieder endozytiert werden. In einem recycling pathway wird das in den frühen Endosomen (fES) transportierte APP wieder an die Plasmamembran transportiert (grüne Pfeile). Ein Teil des APP in den fES wird aber auch über späte Endosomen (sES) und Lysosomen (Endosomal-Lysosomales-System; blaue Pfeile) (C) Bei Verhinderung der essentiellen post-translationalen Modifikationen oder durch eine verstärkte Bindung im ER wird das APP in das Zytoplasma retro-transloziert und durch das proteasomale System abgebaut.

### 1.4.5 Die biologische Funktion des APP

Erstmalig wurde das APP als autokriner Wachstumsfaktor von Saitoh et al. (1989) beschrieben. Die Unterdrückung der APP-Expression durch ein *anti-sense*-Konstrukt führte zu einer deutlichen Einschränkung des Zellwachstums, das durch rekombinantes APP oder konditioniertes Medium revertiert werden konnte (Saitoh et al., 1989). Weitere Publikationen folgten, in denen die proliferationssteigernde Wirkung auf die Pentapeptid-Sequenz RERMS (APP-(328-332)) im N-Terminus eingegrenzt werden konnte (Ninomiya et al., 1993). Ein 17-mer Peptid, das jene Sequenz beinhaltet, konnte nicht nur das Zellwachstum, sondern auch das Neuritenwachstum in neuronalen Zellen stimulieren (Jin et al., 1994). Weitere Studien zeigten, dass sAPP $\alpha$  und sAPP $\beta$  über unterschiedliche biologische Eigenschaften verfügen. sAPP $\alpha$  zeigte eine 100-fach stärkere Neuroprotektion gegen neurotoxische Konditionen als das 17 Aminosäuren kürzere sAPP $\beta$ . Dies könnte zum einen daran liegen, dass die Halbwertszeit von sAPP $\alpha$  (>7h) länger ist als die von sAPP $\beta$  (~ 5-6h) und zum anderen, dass sAPP $\beta$  spezifisch einen pro-apoptotischen Signaltransduktionsweg (DR6/Caspase 6; *death receptor 6*) aktivieren kann (Morales-Corraliza et al., 2009; Nikolaev et al., 2009).

Es ist weiterhin ungeklärt, über welchen Rezeptor sAPP $\alpha$  protektive Signaltransduktionskaskaden auslöst. Caille et al. (2004) zeigten in einem *in-vivo*-Modell, dass intraventrikulär appliziertes sAPP $\alpha$  gezielt das Wachstum von EGFR (*epidermal growth factor receptor*)-exprimierenden neuronalen Vorläuferzellen in Abhängigkeit von EGF steigern konnte. Sowohl die Blockierung der  $\alpha$ -Sekretase, die Reduktion von sAPP $\alpha$  durch Antikörper, als auch der Einsatz von *anti-sense*-Oligonukleotiden führten zu einer signifikanten Proliferationsinhibition der EGFR-exprimierenden neuronalen Stammzellpopulation. Die Autoren vermuteten, dass EGF zusammen mit sAPP $\alpha$  EGFR-vermittelte Signalkaskaden modulieren und potenzieren kann (Caille et al., 2004). Ebenfalls wurde in einer aktuellen Publikation propagiert, dass APP selbst als Zellrezeptor fungieren kann. Gralle et al. (2009) konnten durch Einsatz der FRET (*Förster resonance energy transfer*)-Mikroskopie zeigen, dass die Bindung von sAPP $\alpha$  zu einer Monomerisierung von membranständigen APP-Dimeren führt und dadurch das Zellwachstum gesteigert wird. In einem artifiziellen APP-Konstrukt, in dem APP-Dimere durch eine kovalente Disulfid-Brücke verbunden waren, konnte sAPP $\alpha$  keine Proliferationssteigerung auslösen. Somit folgerten die Autoren, dass mit der Disruption der Dimere proliferative Signalkaskaden aktiviert werden (Gralle et al., 2009).

Neben der wachstumssteigernden Funktion konnte auch nachgewiesen werden, dass APP auch pro-migratorische Eigenschaften besitzt. *In vitro* konnte eine Behandlung mit sAPP $\alpha$  in Keratinozyten, Schilddrüsen- und neuronalen Stammzellen, nicht nur die Proliferation, sondern ebenfalls auch die Migrationsfähigkeit signifikant erhöhen (Schmitz et al., 2002; Siemes et al., 2004; Wehner et al., 2004; Kwak et al., 2006). Young-Pearse et al. (2007) konnten durch Einsatz von shRNA (*short harpin RNA*) *in utero* die APP-Expression in neuronalen Vorläuferzellen runterregulieren und damit zeigen, dass APP-defiziente Zellen nicht korrekt in die kortikalen Schichten wandern (Young-Pearse et al., 2007). In der darauf folgenden Publikation bestätigte die Arbeitsgruppe ihre Ergebnisse und zeigte, dass APP mit dem neuronalen Adaptorprotein DISC-1 (*disrupted in schizophrenia 1*) interagiert und dadurch die Migration von neuronalen Vorläuferzellen steuert (Young-Pearse et al., 2010). Ob APP selbst oder durch Interaktion mit anderen pro-migratorischen Faktoren in nicht-neuronalen Zellen die Migration moduliert, ist derzeit noch ungeklärt.

Trotz der oben genannten Beobachtungen zeigten APP-*knock-out*-Mäuse (APP<sup>-/-</sup>), in denen beide Allele ausgeschaltet sind, nur einen minimalen Phänotyp (reduziertes Körpergewicht, Griffstärke und Bewegungsaktivität) im Vergleich zu den Wildtyp-Mäusen (Müller U et al., 1994; Zheng et al., 1995). APLP2-*knock-out*-Mäuse (APLP2<sup>-/-</sup>) präsentieren hingegen gar keinen Phänotyp (von Koch et al., 1997). Die Kreuzung der Einzelmutanten miteinander zeigte, dass Doppelmutanten des Typs APLP2<sup>-/-</sup>/APLP1<sup>-/-</sup> und APLP2<sup>-/-</sup>/APP<sup>-/-</sup> postnatal letal waren, wohingegen die APLP1<sup>-/-</sup>/APP<sup>-/-</sup>-Doppelmutanten lebensfähig waren (von Koch et al., 1997). Das Fehlen eines APP<sup>-/-</sup> Phänotyps wurde dadurch erklärt, dass die zwei APP-Homologe (APLP1 und APLP2) den Verlust vom APP partiell kompensieren konnten (Heber et al., 2000). Wenngleich die Versuche mit defizienten Mauslinien für physiologische Funktionen der APP-Familie sprechen, die von allen Mitgliedern redundant übernommen werden können, deuten einige Ergebnisse auch auf Funktionen hin, die nur von APP, nicht aber von den übrigen Familienmitgliedern erfüllt werden können. Gestützt wird diese These durch die zum Teil hoch heterologen Proteinbereiche innerhalb der APP-Familie. Zum anderen konnte durch Verwendung von *knock-in*-Modellen gezeigt werden, dass sAPP $\alpha$  eine wichtige Stellung in der postnatalen Entwicklung einnimmt. So konnte durch die Kreuzung von sAPP $\beta$ -KI-(*knock-in*)-Mäusen mit APLP2<sup>-/-</sup>/APP<sup>-/-</sup>-Doppelmutanten der post-natal letale Phänotyp nicht revertiert werden (Li H et al., 2010). Hingegen waren Kreuzungen von sAPP $\alpha$ -KI-Mäusen mit APLP2<sup>-/-</sup>/APP<sup>-/-</sup>-Doppel-*knock-out*-Mäusen nicht nur viabel, sondern

wiesen auch nur geringe neurologische Abnormalitäten gegenüber Kontrolltieren auf (Müller U et al., 2010; Weyer et al., 2011).

## 1.5 Bedeutung von Wachstumsfaktoren in der Tumorphathogenese

Wachstumsfaktoren sind für jede lebende Zelle wichtig. In normalem Gewebe regulieren darüber hinaus verschiedene anti-proliferative Signale das Zellwachstum und wirken den Wachstumsfaktoren entgegen. Hanahan und Weinberg (2000) postulierten, dass maligne entartete Zellen verschiedene Fähigkeiten erwerben müssen um zelluläre Regulationsmechanismen zu umgehen. Die Ursache der Tumorentstehung ist höchstwahrscheinlich nicht auf ein einzelnes Ereignis, sondern vielmehr auf die Summe von sechs verschiedenen Vorkommnissen zurückzuführen.

Diese sind die zum einen die Selbstversorgung mit Wachstumssignalen, das Unempfinden gegen wachstumshemmende Signale, Umgehung des programmierten Zelltodes (Apoptose), grenzenloses unkontrolliertes Wachstum, anhaltende Gefäßneubildung und die Fähigkeit zu metastasieren (Hanahan & Weinberg, 2000; Hahn WC & Weinberg, 2002). In einer aktuellen Übersicht von Hanahan und Weinberg (2011) wurden zwei weitere essentielle Charakteristika hinzugefügt: Die genomische Instabilität und die Tumor-assoziierte Inflammation (Hanahan & Weinberg, 2011).

Pathophysiologische Veränderungen zeichnen Krebszellen aus, die sie unabhängig von extrazellulären Stimuli werden lassen. So kann durch die Sekretion von Wachstumsfaktoren einer Zelle ermöglicht werden sich selbst mit proliferations-fördernden Botenstoffen zu versorgen (Autarkie). Dabei können die wachstumsfördernden Stoffe sowohl von der eigentlichen Tumorzelle produziert werden und somit autokrin wirken, als auch durch benachbarte Zellen (*Bystander*-Zellen) hergestellt werden die wiederum das Wachstum von Krebszellen stimulieren (parakrine Wirkung). Des Weiteren kann die Störung des Gleichgewichts auch durch eine Überexpression von wachstumsfaktorspezifischen Rezeptoren zurückgehen. So konnte beispielsweise in verschiedenen Plattenepithelkarzinomen als auch im Magenkarzinom eine Überexpression des EGFR als auch des Liganden TGF- $\alpha$  (*tumor growth factor alpha*) festgestellt werden (Reiss et al., 1991; Yonemura et al., 1992). Bis zu 40% aller malignen Hirntumore (Glioblastoma multiforme), 8-20% aller Kopf-Hals-Tumore und 8-14% aller Speiseröhrentumore haben eine Amplifikation (gezielte Vermehrung von DNA-Abschnitten) des EGFR-Gens. Am Beispiel des EGFR konnte auch gezeigt werden, dass eine Überrepräsentation dieses Rezeptors, unabhängig von der Tumorentität mit einer deutlich schlechteren Prognose verbunden ist (Rajkumar, 2001).

Im Gegensatz zu gesunden, normalen Zellen, wo externe Signale das Wachstum regulieren, können sich Tumorzellen von diesen Signalen abkoppeln. Hier sind vor allem Onkogene wie

das ras-Protein (*rat sarcoma*) involviert, die jene zelluläre Proliferation auch in Abwesenheit von Wachstumssignalen aufrechterhalten (Dunn et al., 2005). In verschiedenen Krebsarten konnten strukturelle genetische Veränderungen, wie Punktmutationen nachgewiesen werden, die eine unkontrollierte Signalübermittlung ermöglichen. Das Wachstum von Tumoren wird nicht nur durch die Proliferation, sondern auch auf die Modulation von pro-apoptotischen Bedingungen bestimmt. Erfolgreiche Tumorzellen müssen daher eine Resistenz gegen über der Apoptose ausbilden. In physiologischen Zellen spielen Tumorsuppressorgene wie p16, p53, Rb (*retinoblastoma protein*) und DPC4 (*deleted in pancreatic carcinoma, locus 4*) eine essentielle Rolle, um eine Hemmung des Zellzyklus und die Induktion einer Apoptose die Zellproliferation zu kontrollieren. Eine Inaktivierung dieser Gene, wie sie bei den meisten Tumoren vorkommen, resultiert in unkontrolliertem Wachstum (Burgering et al., 1993). Auch hier spielen Wachstumsfaktoren eine bedeutende Rolle. Durch die Inhibition von pro-apoptotischen Signalkaskaden kann das Überleben von Tumorzellen gesichert werden. Gezeigt werden konnte dies bereits für Wachstumsfaktoren, wie IGF-1 (*insulin like growth factor 1*) und PDGF (*platelet derived growth factor*) (Harrington et al., 1994).

Die bisher erwähnten Eigenschaften angehender Tumorzellen sind von entscheidender Bedeutung, um diese von externen und internen regulatorischen Faktoren abzukoppeln und dadurch eine ungehemmte Proliferation zu ermöglichen.

Im Rahmen dieser Dissertation konnte ein Zusammenhang zwischen dem APP und malignen Tumoren festgestellt werden. Hierbei wurden sowohl gastrointerstinale Tumore, als auch testikuläre Keimzelltumore untersucht. Um ein besseres Verständnis über die Relevanz des APP als Wachstumsfaktor zu bekommen, wird in den folgenden Abschnitten näher über die individuelle Tumorphathogenese und die derzeitigen Therapieansätze eingegangen.

### **1.5.1 Pathogenese des kolorektalen Karzinoms**

Das kolorektale Karzinom (Darmkrebs) zählt zu den häufigsten Tumoren des Menschen. Weltweit liegt die Inzidenz bei Männern an dritter und bei Frauen an zweiter Stelle. Jenseits des 50. Lebensjahres steigt diese stark an und verdoppelt sich dann mit jeder Lebensdekade. Nach dem Bronchialkarzinom steht das Kolon- und Rektumkarzinom in Europa an der zweiten Stelle der Mortalitätsskala (Jemal et al., 2005).

Gemäß der WHO-Klassifikation können insgesamt acht Karzinomtypen patho-histologisch differenziert werden. Das Adenokarzinom ist mit einem Vorkommen von über 80% die

häufigste Form, gefolgt vom muzinösen Adenokarzinom (oder auch Gallertkarzinom genannt), und dem Siegelringkarzinom. Letzterer histologischer Typ geht mit einer sehr schlechten Prognose einher.

Beim Kolorektalkarzinom wird grundsätzlich zwischen sporadischen und hereditären Formen unterschieden. Dabei machen die sporadischen Tumore etwa 85% aus, während die hereditären Formen sich auf etwa 15% belaufen. Wie bei den meisten anderen malignen Tumorentitäten, stellen Mutationen in Schlüsselgenen einen zentralen Mechanismus der Tumorentwicklung dar. Hierbei sind insbesondere Onkogene, Tumorsuppressorgene und DNA-Reperaturgene betroffen. In der Pathogenese des sporadischen kolorektalen Karzinoms geht man davon aus, dass diese sich aus gutartigen Adenomen entwickeln. Große und villöse Polypen haben dementsprechend ein höheres Risiko zu entarten. Die Progression vom gesunden Epithel zum malignen Adenokarzinom wurde erstmals auf patho-histologischer Ebene von Muto et al. (1975) und später auf molekularer Ebene von Vogelstein et al. (1988) beschrieben (Muto et al., 1975; Vogelstein et al., 1988). Dabei kann man zur histologischen Entartung ebenfalls eine sukzessive Zunahme von genomischen Alteration nachweisen. Hierbei spielen Onkogene, wie das k-ras und Tumorsuppressorgene wie das p53 und das APC (*adenoma polyposis coli*) eine bedeutende Rolle. Ein anderer, gut beschriebener molekularer Entstehungsweg ist der Mikrosatelliteninstabilitäts-Signalweg. Dieser ist gekennzeichnet durch spezifische Veränderungen von DNA-Reparatur-Genen (wie MSH2, MLH1 und PMS1/2). Diese können bei sporadischen Formen in etwa 16% und bei hereditären Tumoren in bis zu 85% detektiert werden (Aaltonen & Peltomaki, 1994). Bei hereditären Karzinomen wird das Vorhandensein von Keimbahnmutationen postuliert. Das Auftreten von somatischen Mutationen auf dem korrespondierenden Allel führt schließlich zu einem kompletten genetischen Verlust und damit zur Tumorentstehung. Dieses Modell wird auch als *Two-Hit*-Hypothese bezeichnet (Knudson, 1971).

Neben diesen grundlegenden genetischen Veränderungen, wird die Onkogenese ebenfalls von einer Vielzahl von autokrin und parakrin wirkenden Wachstumsfaktoren moduliert. Diese sind nicht nur am Tumorwachstum, sondern auch an der Regulation der Angiogenese (Ausbildung von neuen Gefäßstrukturen) beteiligt. Diese Mechanismen sind essentiell für die Progression des malignen Leidens und bieten daher spezifische therapeutische Ansatzpunkte. In der Therapie dieser Tumorentität kommt der chirurgischen Resektion nach wie vor eine vorrangige Bedeutung zu. Trotz einer optimalen Operationstechnik, entwickeln nach einer alleinigen chirurgischen Resektion etwa die Hälfte aller Patienten ein Rezidiv (Midgley & Kerr, 1999). Unbefriedigende Ergebnisse bei alleiniger operativer Behandlung sind in

höhergradigen Tumoren zu sehen und sind wahrscheinlich auf bereits vorhandene Mikrometastasen zurückzuführen. Daraus leitet sich ein Interesse an einer adjuvanten, also einer unterstützenden systemischen Chemotherapie ab. Heutzutage gilt die Gabe von 5-Fluorouracil und Folinsäure als Standardtherapie. So konnte mit dieser zusätzlichen Behandlung das Rezidiv-Risiko auf ein Drittel reduziert werden (Macdonald, 2004). In einer neueren Studie konnten Hinweise gefunden werden, dass eine Ergänzung mit Oxaliplatin, das rezidivfreie Überleben beim Kolonkarzinom signifikant verbessert (Andre et al., 2009).

Das individuelle Risiko im Laufe des Lebens an einem kolorektalen Karzinom zu erkranken beträgt etwa 6%. Das Langzeitüberleben ist hauptsächlich vom Tumorstadium abhängig. Eine definitive Heilung, insbesondere der frühen Tumorstadien, ist durch eine chirurgische Therapie möglich. Bei einer therapeutisch-kurativen Resektion beträgt die Fünf-Jahres-Überlebensrate in Deutschland bei Männern derzeit 48% und bei Frauen ungefähr 51% (Arnold & Blum, 2005). Insgesamt aber verstirbt immer noch etwa die Hälfte der Patienten an dieser Erkrankung (Jemal et al, 2005).

### **1.5.2 Pathogenese des Pankreaskarzinoms**

Das Pankreaskarzinom (Bauchspeicheldrüsenkrebs) stellt die fünfthäufigste Todesursache durch bösartige Neoplasien in der westlichen Welt dar, obwohl diese Entität von den absoluten Zahlen aller Tumorerkrankungen nicht zu den häufigen zählt (Murr et al., 1994).

Pathohistologisch lassen sich verschiedene Formen unterscheiden. Bei weitem am häufigsten sind duktale Adenokarzinome (80-85%), die vom Gangsystem des Pankreas ausgehen (Chowdhury & Rayford, 2000). Insbesondere beim Pankreaskarzinom gilt der Grundsatz, dass die Heilungs- und Überlebenschance umso besser sind, je früher der Tumor erkannt wird. Trotz alledem sind die in den letzten 10 Jahren erreichten Fortschritte in der Diagnostik kaum zum Tragen gekommen, da die klinischen Symptome zu Beginn der Erkrankung häufig uncharakteristisch sind. Im Vergleich zu anderen Malignomen ist das Pankreaskarzinom mit einer äußerst schlechten Prognose behaftet. Dies liegt zum einen daran, dass bereits über 90% der Patienten bei Diagnosestellung einen lokal fortgeschrittenen Tumor oder gar Fernmetastasen haben und dadurch einer operativen Therapie nicht mehr zugänglich sind und zum anderen das Pankreaskarzinome trotz der heutigen Therapie (wie einer Bestrahlung oder einer Chemotherapie mit 5-Fluorouracil, Paclitaxel oder Docetaxel) kaum heilbar sind (Sener et al., 1999). Der durchschnittliche Überlebenszeitraum von Patienten, die nicht mehr durch

eine Operation behandelt worden sind, beträgt 4-6 Monate. Die Fünf-Jahres-Überlebensrate aller Patienten liegt unter 3% (Rosewicz & Wiedenmann, 1997).

Die molekulare Ebene vom Pankreaskarzinom ist nicht vollständig aufgeklärt. So scheint neben der Aktivierung von Onkogenen, wie dem k-ras auch die funktionelle Inaktivierung von Tumorsuppressorgenen (wie p16, p53, Rb und DPC4) eine essentielle Rolle zu spielen (Hahn SA & Schmiegel, 1998). Der Großteil aller Pankreaskarzinome besitzt mindesten drei dieser genetischen Mutationen, was möglicherweise auch eine Erklärung für die Beobachtung ist, dass Pankreaskarzinome sehr schlecht auf eine Chemo- und Bestrahlungstherapie ansprechen (Lionetto et al., 1995). Sowohl eine operative Behandlung als auch die Chemo- und Strahlentherapie haben nur eine palliative Bedeutung und führen nicht zu einer signifikanten Beeinflussung der Überlebenszeit (Clark JW et al., 1996; Glimelius, 1998). Eine präoperative Radiochemotherapie hat nur zu einer Verbesserung der Lebensqualität geführt, jedoch in keinem Fall zu einer Heilung. Bis vor kurzem bestand die Standard-Therapie für das fortgeschrittene Pankreaskarzinom aus 5-Fluorouracil, entweder allein oder in Kombination mit anderen Chemotherapeutika und einer Bestrahlung. In den letzten Jahren zeigte sich aber, dass die Ansprechrate unter 10% liegt und keine Effekte auf das Überleben oder die Lebensqualität nachweisbar waren (Burriss et al., 1997). Derzeit wird als Chemotherapeutikum bei der Behandlung des nicht-operativen Pankreaskarzinoms das Gemcitabine verwendet. Im Vergleich zu 5-Fluorouracil konnte in klinischen Studien eine größere Effektivität und geringere Nebenwirkungen nachgewiesen werden. Trotz bescheidener Ansprechraten konnte in Bezug auf eine Stabilisierung des Krankheitsverlaufs, eine längere Überlebenszeit festgestellt werden (Burriss et al, 1997; Brus & Saif, 2010). Gegenwärtig existieren keine kurativen Therapieansätze für das nicht-resezierbare Pankreaskarzinom, so dass alternative Therapiestrategien dringend erforderlich sind.

### **1.5.3 Pathogenese der testikulären Keimzelltumore**

Das klassische Modell der Keimzelltumorentwicklung beschreibt die primordiale Keimzelle als Ursprungszelle der malignen testikulären Keimzelltumore (WHO-Klassifikation Typ II). Aus dieser entwickelt sich die so genannte testikuläre intraepitheliale Neoplasie (TIN) die auch als *Carcinoma in situ* bezeichnet wird. Diese stellt eine Vorläuferläsion dar, aus der sich das Seminom und das embryonale Karzinom (Nicht-Seminom) entwickeln. Aus den undifferenzierten, pluripotenten embryonalen Karzinomen können sich differenzierte

Subtypen, wie die extraembryonal differenzierten Dottersacktumore, Chorionkarzinome und das Teratom (somatisch differenzierte Zellen) entwickeln. Neben homogenen, reinen Subtypen, die aus einem einheitlichen histologischen Subtyp bestehen, kommen auch Mischformen, die aus verschiedenen differenzierten und undifferenzierten Entitäten bestehen vor. Letztere Formen bezeichnet man auch als gemischte Nicht-Seminome (Woodward PJ, 2004). Klassische Seminome ähneln sowohl morphologisch, als auch in ihrem Expressionsprofil stark primordialen Keimzellen (Gonozyten). Embryonale Karzinome werden als malignes Gegenstück zu pluripotenten, embryonalen Stammzellen angesehen und besitzen eine ähnliche Differenzierungspotenz *in-vitro* und *in-vivo* (Andrews, 1998; Horwich et al., 2006). Auch hier spiegeln sich die unterschiedlichen Differenzierungsstadien auf molekularer Ebene wieder. So exprimieren die embryonalen Karzinome genau wie die Seminome, die Stammzellmarker NANOG (abgeleitet von dem Wort *Tír na nÓg*, „Land der ewigen Jugend“) und Oct-3/4 (*octamer binding transcription factor 3/4*). Im Gegensatz zum Seminom zeichnen sich embryonale Karzinome durch eine starke Expression des Pluripotenzmarkers Sox2 (*sex determining region Y-box 2*) aus (Looijenga, 2009b). Da das klassische Seminom negativ für Sox2 ist wird vermutet, dass die Funktion dieses Stammzellgens durch das homologe Sox17 übernommen wird. Dadurch ist eine funktionelle Redundanz dieser beiden Proteine denkbar (de Jong et al., 2008). Das Stammzellgen Sox2 ist einer der Hauptregulatoren der Pluripotenzerhaltung in embryonalen Stammzellen. In der frühembryonalen Phase ist die Expression von Sox2 auf Zellen mit Stammzeleigenschaften beschränkt. Hingegen ist die Expression von Sox2 in Zellen mit limitiertem Entwicklungspotential herunterreguliert. Die Rolle von Sox2 in der Erhaltung der Pluripotenz konnte durch funktionelle Analysen gezeigt werden. Durch den selektiven Verlust von Sox2 differenzierten embryonale Stammzellen der Maus spontan in Trophoektoderm und Mesentoderm (Avilion et al., 2003; Ivanova et al., 2006).

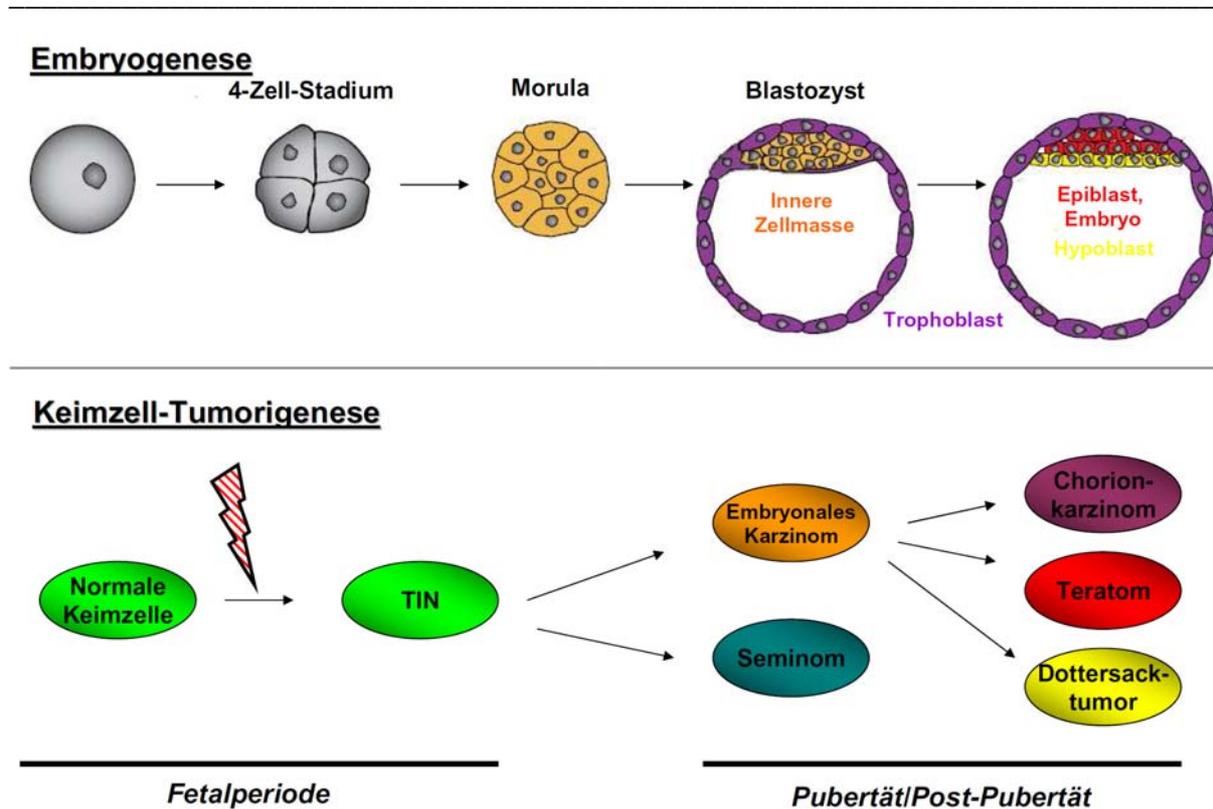
Der Transkriptionsfaktor Oct-3/4 wird als diagnostischer Marker von undifferenzierten Typ-II-Keimzelltumoren seit langem diskutiert (Looijenga et al., 2003a; de Jong et al., 2005; de Jong & Looijenga, 2006; Cheng L et al., 2007). Dieser Marker ist positiv in TIN-Zellen, in Seminomen und Embryonalzellkarzinomen (Looijenga, 2009a). Dies ist von großer Bedeutung, weil spezifische Antikörper diesen Marker reproduzierbar nachweisen können und somit die Positivität von Oct-3/4 einen wesentlichen Beitrag zur Identifikation von testikulären Keimzelltumoren leistet. Funktionell ist dieses Stammzellgen an regulatorischen Funktionen von embryonalen Stammzellen beteiligt. So führt der Verlust der Expression von Oct-3/4 zur Apoptose, so dass die Hypothese besteht, dass dieser Transkriptionsfaktor eine

wichtige Rolle für das Überleben von Stammzellen spielt (Kehler et al., 2004). Oct-3/4 spielt auch eine Schlüsselrolle im Erhalt der Pluripotenz. So führt sowohl der Verlust als auch die Überexpression von Oct-3/4 zu einer Differenzierung (Niwa et al., 2000). Dadurch wird vermutet, dass durch das Zusammenspiel mit anderen Stammzellgenen die Spiegel von Oct-3/4 konstant gehalten werden um einen pluripotenten Status zu erhalten (Boyer et al., 2006).

Der Transkriptionsfaktor NANOG ist ein weiterer Marker der pluripotenten Keimzelle. Ähnlich wie Oct-3/4 sind TIN-Zellen, Seminome und embryonale Karzinome stark positiv für NANOG (Clark AT et al., 2004; Hart et al., 2005). NANOG ist essentiell an der Erhaltung und Selbsterneuerung von undifferenzierten embryonalen Stammzellen beteiligt. Während die undifferenzierte Proliferation muriner embryonaler Stammzellen *in vitro* die Gegenwart von „leukemia inhibitory factor“ (LIF) erfordert, können durch eine Überexpression von NANOG, embryonale Stammzellen unabhängig von LIF und ohne Verlust der Pluripotenz kultiviert werden (Chambers et al., 2003). Ein Verlust von NANOG führt hingegen zu einer Differenzierung von Stammzellen (Hyslop et al., 2005).

NANOG bildet zusammen mit den Transkriptionsfaktoren Oct-3/4 und Sox2 ein regulatorisches Netzwerk das effektiv die Selbsterneuerung fördert und für den Erhalt der Pluripotenz in embryonalen Stammzellen notwendig ist.

Durch die Nähe zu embryonalen Stammzellen und den Ähnlichkeiten im Differenzierungspotential, können durch das Studium der testikulären Keimzelltumore, somit Aussagen über entwicklungsgeschichtliche und stammzellbiologische Vorgänge getroffen werden (Abb. 1.4).



**Abb. 1.4: Die Ähnlichkeiten zwischen der Embryonalentwicklung und der Keimzell-Tumorigenese.** Dargestellt sind hier die verschiedenen Stadien der Embryogenese (oben) und der Tumorigenese (unten). Farblich gleich unterlegt sind die ähnlichen Stadien zwischen beiden Vorgängen. Korrespondierend zur inneren Zellmasse (orange) ist das embryonale Karzinom. Dem Trophozytoblasten (lila) kann man das Chorionkarzinom zuordnen, wie man auch den Hypoblasten (primitives Entoderm, gelb) dem Dottersacktumor zuordnen kann. Dem Epiblasten (rot), aus dem sich der Embryo später entwickelt, kann man das somatisch differenzierte Teratom zuordnen. TIN, testikuläre intraepitheliale Neoplasie. Die Abbildung ist modifiziert nach Skotheim et al., 2005 (S.5589).

Testikuläre Keimzelltumore stellen nur 1% alle Tumorentitäten dar, sind aber in den westlichen Industrienationen (Europa und Nordamerika) die häufigsten Malignome von Männern zwischen 18 und 45 Jahren. Ihre Inzidenz ist weiter ansteigend (Adami et al., 1994; Looijenga, 2009a). Als Risikofaktoren gelten Kryptorchismus (Lageanomalie des Hodens, Hodenhochstand) und das Klinefelter-Syndrom (numerische Chromosomenaberration; 47, XXY), wobei beim letzteren gehäuft auch extra-gonadal im Mediastinum Keimzelltumore auftreten (Bosl & Motzer, 1997). Wie bereits erwähnt, gilt die TIN als Vorläuferläsion der Keimzelltumore und geht nach 8-10 Jahren nach Auftreten in einen invasiven Tumor über (Looijenga et al., 2003b). Die Entstehung der Keimzellneoplasie basiert auf der konstanten genetischen Veränderung in Form von Amplifikationen spezifischer Regionen des kurzen Arms des Chromosom 12 (Isochromosom 12p) (Rosenberg et al., 2000). Interessanterweise liegen im Locus 12p13 unter anderem die Pluripotenzgene NANOG und GDF3 (*growth differentiation factor 3*). Auch weitere wichtige Zellzyklusregulierende Gene wie Cyclin D2,

CDK4 (*cycline dependent kinase 4*) und das Onkoprotein k-ras sind auf dem Chromosom 12 lokalisiert. Eine Störung dieser Gene wird als Auslöser der Keimzellneoplasien angesehen (Looijenga et al, 2003b).

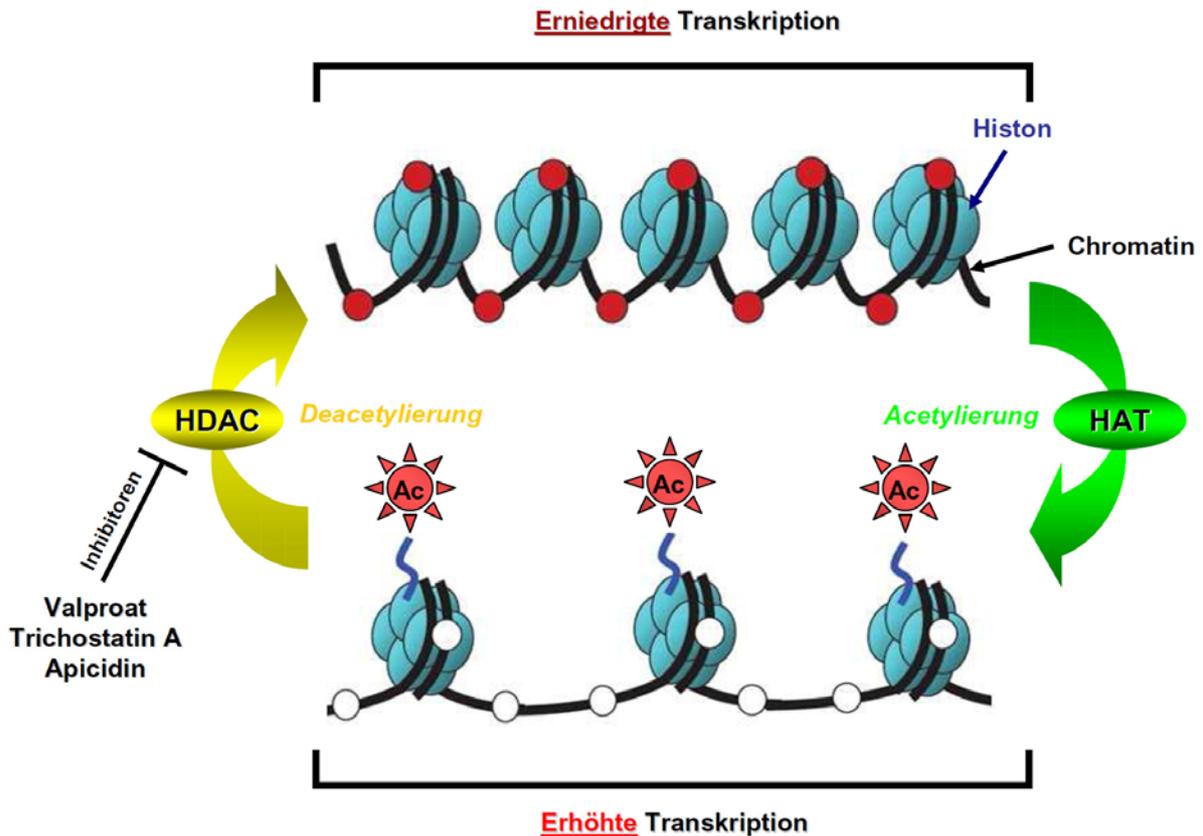
Mit der Einführung von Cisplatin in den 70er bei der Behandlung von testikulären Keimzelltumoren, hat sich die Prognose dieser Tumorform dramatisch verbessert (Einhorn & Donohue, 1977). Aufgrund der ausgesprochen starken Chemosensitivität können heute über 90% der Patienten, auch mit metastasierten Tumoren, dauerhaft geheilt werden. Im Gegensatz zu anderen Malignomen, gilt daher diese Tumorentität als Modell einer kurativen Tumorerkrankung (Horwich et al, 2006).

## **1.6 Epigenetik**

Epigenetik beschreibt die Vererbung von Eigenschaften auf Tochterzellen, die nicht in der DNA-Sequenz festgelegt wurden. Hierbei werden durch Änderungen der Chromatinkonformation die Aktivitäten von Genen moduliert.

### **1.6.1 Die post-translationalen Modifikationen von Histonen**

Das Chromatin eukaryontischer Zellen liegt in einem kompakten Zustand im Zellkern vor. Histone spielen dabei eine entscheidende Rolle bei der Konformation und damit der sterischen Anordnung des Chromatins. Die N-terminalen Regionen (Lysin-Reste) der Histone stellen Angriffspunkte für verschiedenste post-translationale Modifikationen dar (Wu & Grunstein, 2000). Insbesondere das dynamische Gleichgewicht zwischen Acetylierung und Deacetylierung spielt hierbei eine essentielle Rolle. Dieses Gleichgewicht wird von zwei kompetitiven Enzymfamilien, den Histonacetyltransferasen (HAT) und den Histondeacetylasen (HDAC) reguliert (Marks et al., 2000). Die Acetylierung der Histone wird durch die HAT katalysiert. Durch die negativ beladenen Acetylgruppen, erhalten die Histone eine negative Ladung, was zu einer Abstoßung des ebenfalls negativ geladenen Phosphat-Rückgrats der DNA führt. Die Folge ist somit eine verringerte Packungsdichte der DNA. Dies ermöglicht Transkriptionsfaktoren eine Interaktion mit der DNA, was zu einer erhöhten Transkription von Genen führt. HDAC hingegen bewirken eine Abspaltung der negativ geladenen Acetylgruppen und führen zur Erhöhung der Packungsdichte der DNA. Dadurch resultiert eine Repression der Transkription. Die pharmakologische Inhibition der HDAC-Enzyme führt dementsprechend zu einer Erhöhung der HAT-Aktivität, was in einer Hyperacetylierung von Histonen resultiert und damit die Transkription diverser Gene induziert (Drummond et al., 2005) (Abb.1.5).



**Abb. 1.5: Modulation der Gentranskription durch epigenetische Modifikationen.** Die Konformationen des Chromatins (schwarz) sind abhängig von Modifikationen der Histone (blau). Die Acetylierung (Ac) der Histone durch HAT (Histonacetyltransferasen, grün) führt zu einer dekondensierten Chromatinstruktur und ist mit einer erhöhten Aktivität von Gen-Transkriptionen verbunden. Die Deacetylierung durch HDAC (Histondeacetylasen, gelb) löst eine Kondensation des Chromatins aus und geht entsprechend mit einer Repression der Gentranskription einher. Die Abbildung ist angelehnt an deRuijter et al., 2003 (S.738).

## 1.6.2 Der epigenetische Therapieansatz zur Behandlung von Tumoren

Es besteht ein starker funktioneller Zusammenhang zwischen einer vermehrten HDAC-Aktivität und der Entstehung maligner Neoplasien. Immunhistochemische als auch RT-PCR Analysen verschiedener soliden Tumoren (wie beim Gebärmuttersarkom, Kolorektalkarzinom und Magenkarzinom) bestätigten in maligne entartetem Gewebe eine signifikant erhöhte HDAC-Expression (Huang BH et al., 2005; Hrzenjak et al., 2006; Mutze et al., 2010). Die HDAC zählen zu einer hoch konservierten Enzymfamilie und kommen sowohl in Eu- als auch Prokaryonten vor. Sie werden entsprechend ihrer Sequenzhomologie und Domänenverwandtschaft in 4 Klassen unterteilt. Klasse I, II und IV sind nah miteinander verwandte, Zink-abhängige Deacetylasen. HDAC-Klasse III ist im Gegensatz zu den anderen,  $\text{NAD}^+$ -(Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid) abhängig (Tab. 1.1).

Klasse I	HDAC1, 2, 3 und HDAC8
Klasse IIa	HDAC4, 5, 7 und HDAC9
Klasse IIb	HDAC6 und HDAC10
Klasse III	SIRT1-7 (Homologe des SIR2 Proteins der Hefe Saccharomyces cerevisiae)
Klasse IV	HDAC11

**Tab. 1.1: Klassifikation der Histondeacetylasen (HDAC).**

Die Tabelle ist modifiziert nach Müller S & Krämer, 2010 (S. 211) wiedergegeben.

Die Transkription regulatorischer Proteine, die essentielle Funktionen in der Zellzykluskontrolle oder der Apoptose einnehmen, wird durch die HDAC unterdrückt (Genblockade). Da diese Gen-Repression reversibel ist, besteht durch HDAC-Inhibitoren die Möglichkeit diesen Prozess zu revertieren. HDAC-Inhibitoren repräsentieren damit eine viel versprechende Gruppe epigenetischer Modulatoren für den pharmakologischen Angriff auf HDAC.

Verschiedene strukturell unterschiedliche Moleküle natürlichen und synthetischen Ursprungs sind bekannt, die eine Aktivität der HDAC inhibieren können. Für HDAC-Inhibitoren wurden diverse anti-neoplastische Effekte *in vitro* und *in vivo* nachgewiesen. So führt die Behandlung zum Zellzyklus-Arrest, zur Differenzierung und zum Absterben maligner Zellen (Drummond et al., 2005). Dabei weisen HDAC-Inhibitoren im Allgemeinen nur eine geringe Toxizität gegenüber normalen, nicht malignen Zellen auf (Kelly & Marks, 2005; Liu et al., 2006; Carew et al., 2008). HDAC-Inhibitoren modulieren unterschiedliche zelluläre Signalwege, die wiederum auf verschiedenen Mechanismen beruhen. Zum einen werden die Promotoren bestimmter Gene reaktiviert. Zum anderen führt die Inhibition der Deacetylierung von Nicht-Histon-Substraten zu einer direkten Aktivierung von Signalkaskaden (Witt et al., 2009).

Eine Vielzahl heterogener Substanzen ist in der Lage, sehr potent an HDAC zu binden und durch Blockierung der enzymatischen Aktivität eine Hyperacetylierung von Histonen zu bewirken. In Tab 1.2 sind die verschiedenen HDAC-Inhibitoren gemäß ihrer chemischen Struktur klassifiziert.

Klasse	Substanzen	Wirkspektrum
Kurzkettige Fettsäuren	<u>Natriumbutyrat (NaB)</u> , <u>Valproat (VPA)</u> , Pivaloyloxymethyl-Butyrate, 4-Phenylbutyrate	$\mu\text{M}$ - $\text{mM}$
Hydroxamsäuren	<u>Trichostatin A (TSA)</u> , Suberoyl-Anilid-Bishydroxamid (SAHA), NPV-LAQ-824, Scriptaid, Oxamflatin, Pyroxamid	$\text{nM}$ - $\mu\text{M}$
Epoxide	Trapoxin A, Depucidin	$\text{nM}$ - $\mu\text{M}$
Zyklische Tetrapeptide	<u>Apicidin</u> , Depsipeptide, Chlamydocin	$\text{nM}$ - $\mu\text{M}$
Hybridmoleküle	CHAP31, CHAP50	$\text{nM}$

**Tab. 1.2: Klassen der HDAC-Inhibitoren.** Hervorgehoben sind die HDAC-Inhibitoren, die in dieser Arbeit verwendet wurden. Die Wirkbereiche der Inhibitoren wurden durch *in vitro*-Experimente evaluiert (Khan et al., 2008; Witt et al., 2009).

Eines der am besten untersuchten HDAC-Inhibitoren ist die kurzkettige Fettsäure Valproat (VPA). Diese Substanz wird seit über 30 Jahren in der Klinik als potentes Antikonvulsivum, Antipsychotikum und zur Therapie der Migräne eingesetzt. Durch die lange klinische Erfahrung konnte zum einen nachgewiesen werden, dass die Substanz neben einer guten Verträglichkeit auch ein günstiges Nebenwirkungsprofil besitzt, was durch die *U.S. Food and Drug Administration* (FDA) bestätigt wurde (Blaheta & Cinatl, 2002; Henry, 2003). VPA kann oral appliziert werden und zeigt mit einer Halbwertszeit von 7-16 Stunden eine adäquate Pharmakokinetik *in vivo* (Blaheta & Cinatl, 2002).

Aktuell wird das VPA in mehreren klinischen Studien zur Behandlung hämatologischer Neoplasien, sowie in einer Reihe von soliden Tumoren, wie Brustkrebs und Gebärmutterhalskrebs getestet (Kuendgen & Gattermann, 2007; Duenas-Gonzalez et al., 2008). Auch andere potente HDAC-Inhibitoren wurden bereits in klinischen Studien positiv evaluiert. So ist der potente HDAC-Inhibitor Suberoyl-Anilid-Bishydroxamid (SAHA, Vorinostat) für die Behandlung des fortgeschrittenen, refraktären, kutanen T-Zelllymphoms zugelassen (Müller S & Krämer, 2010). Ebenfalls wurde in einer Phase-I-Studie erfolgreich das SAHA in Kombination mit Idarubicin bei Patienten mit fortgeschrittener akuter myeloischer Leukämie getestet (Kadia et al., 2011). Trotz der Unklarheit über die genauen Mechanismen die durch HDAC-Inhibitoren induziert werden, stellen diese epigenetischen

Therapeutika dennoch in vielerlei Hinsicht ein viel versprechendes Potential zur Behandlung maligner Erkrankungen dar.

## 1.7 Zielsetzung und Fragestellung der Arbeit

In der vorliegenden Dissertation sollten zwei Hauptprojekte bearbeitet werden. Im ersten Projekt sollte der Einfluss des APP als Wachstumsfaktor in gastrointerstinalen Tumoren untersucht werden. Hierbei wurde gezielt auf das Pankreas- und das Kolonkarzinom fokussiert. Weiterhin sollten die Funktion als auch die Modulation des APP-Metabolismus *in vitro* analysiert werden. Die einzelnen Ziele waren:

- Analyse der Wachstumsfunktion und Bestimmung der funktionellen Domäne des APP *in vitro*
- Expression und Prozessierung des APP in humanen Pankreas- und Kolonkarzinomzelllinien
- Immunhistochemische Analysen der APP-Expression in humanen Pankreas- und Kolonkarzinomen
- Herunterregulation der APP-Expression in Pankreas- und Kolonzelllinien mittels RNA-Interferenz
- Untersuchung des Einflusses des APP auf das Tumorwachstum
- Identifikation von HDAC-Inhibitoren als spezifische Modulatoren des APP-Metabolismus
- Charakterisierung des HDAC-abhängigen Mechanismus auf den APP-Metabolismus.

In einem zweiten (Folge)-Projekt sollte die Relevanz des APP in pluripotenten, transformierten Stammzellen evaluiert werden. Hierbei wurde spezifisch die Rolle im Differenzierungsprozess als auch die tumor- und stammzellbiologischen Konsequenzen einer selektiven Modulation des APP-Metabolismus *in vitro* und *in vivo* untersucht. Die einzelnen Ziele waren:

- Histologische Analyse von humanen testikulären Keimzelltumoren auf die differentielle Expression von APP und APLP2
- Überprüfung der Relevanz des APP-Interaktionsproteins GRP78 in testikulären Keimzelltumoren
- Analyse der Auswirkungen von HDAC-Inhibitoren auf testikuläre Keimzelltumore *in vitro*

- *In-vivo*-Analyse der Modulierbarkeit des APP-Metabolismus in einem etablierten Tumor-Mausmodell
- Histologische Analysen der differentiellen APP-Expression im Tumor-Mausmodell.

## 2. Material und Methoden

### 2.1 Chemikalien und Reagenzien

Chemikalien/Reagenzien	Hersteller
Aceton	Merck, Darmstadt
Aminosäure-Mix (MEM NEAA)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Antifade-Medium	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
Apicidin	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
$\beta$ -Mercaptoethanol	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Chloroform	AppliChem GmbH, Darmstadt
DAB	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
DAPI	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Dimethylsulfoxid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Dimethylsulfoxid, steril filtriert für Zellkultur	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
D-PBS	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Ethanol, absolut	Merck, Darmstadt
Ethanol, 99%, vergällt	Chemie-Vertrieb Hannover, Hannover
Ethylendiamin-tetraacetat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Gentamycin (G418)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Hygromycin B	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
Isopropanol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
L-Glutamin, 200 mM	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Lipofectamine 2000 <sup>®</sup>	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
Lipofectamine LTX Plus <sup>®</sup>	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
Luminol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Methanol	AppliChem GmbH, Darmstadt
Milchpulver	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumbutyrat	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Natriumchlorid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Natriumdodecylsulfat	Carl Roth GmbH, Karlsruhe

## Material und Methoden

Nonidet P-40	Roche Applied Science, Basel, Schweiz
Opti-mem <sup>®</sup>	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
Para-Cumarsäure	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Para-Formaldehyd	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Penicillin /Streptomycin	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
Ponceau S	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Protein Längenstandard	Fermentas International Inc., Burlington, Kanada
Röntgenentwickler ROENTOROLL 25	Tetenal AG, Norderstedt
Röntgen-Fixierlösung SUPERFIX 25	Tetenal AG, Norderstedt
Trichostatin A (TSA)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Tris(hydroxymethyl)-aminomethan	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Triton-X 100	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tween <sup>®</sup> 20	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Valproat (VPA)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
Valpromid (VPM)	Katwijk Chemie BV, Katwijk, Niederlande
VarioGel Tricin SDS Laufpuffer	Anamed-Elektrophorese GmbH, Groß-Bieberau
VarioGel SDS-Probenpuffer	Anamed-Elektrophorese GmbH, Groß-Bieberau
VarioGel Tricin SDS Transferpuffer	Anamed-Elektrophorese GmbH, Groß-Bieberau
Wasserstoffperoxid	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Xylol	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Zellkulturmedien	PAN Biotech GmbH, Aidenbach
<ul style="list-style-type: none"> <li>• DMEM (ohne L-Glutamin, mit 4,5 g/l NaHCO<sub>3</sub>)</li> <li>• DMEM/F12 1:1 (ohne L-Glutamin, mit 1,2 g/l NaHCO<sub>3</sub>)</li> <li>• RPMI 1640 (ohne L-Glutamin, mit 2,0 g/l NaHCO<sub>3</sub>)</li> </ul>	

## 2.2 Biochemikalien und Enzyme

Biochemikalien/Enzyme	Hersteller
Albumin Fraktion V	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Benzonase	Merck Chemicals Ltd, Nottingham, England
Fetales Kälberserum	Biochrom AG, Berlin
Protease-Inhibitor Complete Mini <sup>®</sup>	Roche Applied Science, Basel, Schweiz
Reverse Transkriptase	Thermo Fisher Scientific, Massachusetts, USA
Trypsin (0,25%/EDTA 0,02% in PBS, ohne Kalzium und Magnesiumzusatz)	PAN Biotech GmbH, Aidenbach

## 2.3 Gebrauchswaren

Gebrauchswaren	Hersteller
Amersham Hybond-ECL Membran	GE Healthcare, München
Amicon <sup>®</sup> 30K und 50K Ultra-4 Filterröhrchen	Millipore GmbH, Schwalbach
6-well Zellkulturplatten	Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA
96-well Mikrotiterplatten	Greiner Bio-One GmbH, Solingen
Blottingpapier (Trans-Blot <sup>®</sup> ) 15 x 20 cm (dünn) Cat. No.: 1703956 18,5 x 19 cm (dick) Cat. No.: 1703969	Bio-Rad Laboratories, Kalifornien, USA
Falcon <sup>®</sup> -Röhrchen 15 ml Falcon <sup>®</sup> -Röhrchen 50 ml	Greiner Bio-One GmbH, Solingen
Kryoröhrchen	Biochrom AG, Berlin
Objektträger Superfrost <sup>®</sup> Plus Parafilm <sup>®</sup>	Schütt, Göttingen Paul Marienfeld GmbH & Co. KG, Lauda-Königshofen
Pasteur-Kapillarpipetten	Wilhelm Ulbrich GdbR, Bamberg

## Material und Methoden

Pipettenspitzen	Sarstedt, Nümbrecht
Pipettenspitzen mit Filter	Sarstedt, Nümbrecht
Quarz-Küvetten (UVette® 220-1600 nM)	Eppendorf AG, Hamburg
Reaktionsgefäße (Eppendorf Tubes) 500µl, 1500µl, 2000µl, Safe-lock-Tubes	Greiner Bio-One GmbH, Solingen
Röntgenfilme 13 x 18 cm (CEA RP NEW, Blue sensitive)	CEA, Hamburg
Trypan-Blau-Lösung (0,4%)	Sigma-Aldrich, Deisenhofen
VarioGel 4-12% Polyacrylamid Gel (10 und 15 Bahnen)	Anamed-Elektrophorese GmbH, Groß-Bieberau
Western-Blot-Schwamm (Sponge Pad)	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA
Zellkulturflaschen (25 cm <sup>2</sup> und 75 cm <sup>2</sup> )	Greiner Nunc, Nürtingen
Zellschaber	Sarstedt AG & Co., Nümbrecht

### 2.4 Ausstattung/Geräte

Ausstattung/Geräte	Hersteller
Analytic AC210S (Analysenwaage)	Sartorius AG, Göttingen
Branson Sonifier 150 (Ultraschall)	Heinemann Ultraschall- und Labortechnik, Schwäbisch Gmünd
Bx51 DP50 Mikroskop	Olympus Cooperation, Tokyo, Japan
CKX41 Mikroskop	Olympus Cooperation, Tokyo, Japan
Duomax 1030	Heidolph Instruments GmbH & Co.KG, Schwabach
EcoVac	Schuett-biotec GmbH, Göttingen
Eppendorf Biophotometer	Eppendorf AG, Hamburg
Faster BHA 72 Workbench	W.H. Mahl, Reinraum- und Labortechnik GmbH, Magdeburg

## Material und Methoden

HERAcell 150 CO <sub>2</sub> Inkubator	Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA
Heraeus Biofuge 15	Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA
Heraeus Megafuge 1.0 R Benchtop Zentrifuge	Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA
Kassetten-Abdeckung (für Röntgenfilme)	Dr. Goos-Suprema GmbH, Heidelberg
Kühlplatte Leica EG 1140 C	Leica Vertrieb GmbH, Wetzlar
Lab-Tek™ 4-well chamber slides	Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA
Mikrotom Cool Cut, HM 335 E	MICROM International GmbH, Walldorf
μQuant Mikroplatten-Spektrophotometer	Bio Tek Instruments, Inc., Vermont, USA
Neubauer-improved Zählkammer	LO - Laboroptik GmbH, Friedrichsdorf
pH-Meter, pH192	WTW, Wissenschaftlich- Technische Werkstätten GmbH, Weilheim
Power Station 130 und Power Station Enduro	Labnet International Inc., New Jersey, USA
Stratagene MX3000P Real-Time Cycler	Stratagene/Agilent, Waldbronn
UNO- Thermoblock	Biometra biomedizische Analytik GmbH, Göttingen
Varioklav H+P	Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA
Vortex Genie 2-Mixer	Bender und Hobein AG, Zürich, Schweiz
Wasserbad	Gesellschaft für Labortechnik GmbH, Burgwedel
X-Cell II™	Invitrogen, Carlsbad, Kalifornien, USA

## 2.5 Software/Programme

Software/Programme	Hersteller
Adobe Photoshop 5.5 und 6.0	Adobe Systems Inc., Kalifornien, USA
GraphPad Prism Version 5.0	GraphPad Software Inc., Kalifornien, USA
ImageJ Software	National Institute of Health (NIH), Maryland, USA
Microsoft Office 2003	Microsoft Inc., Washington, USA
Microwin 2000, Version 4.40	Mikrotek Laborsystem, Overath
Relative Expression Software Tool V2.0.7 (REST 2008)	<a href="http://www.gene-quantification.de/rest.html">http://www.gene-quantification.de/rest.html</a> (Pfaffl et al., 2002)

## 2.6 Gebrauchsfertige Reaktionssysteme

Reaktionssysteme	Hersteller
Cell Titer 96 <sup>®</sup> -A <sub>QUEOUS</sub> -Non-Radioactive-Cell-Proliferationassay (MTS)	Promega, Mannheim
CytoTox 96 <sup>®</sup> -Non-Radioactive-Cytotoxicity-Assay (LDH-Assay)	Promega, Mannheim
Fermentas First Strand cDNA Synthesis Kit	Thermo Fisher Scientific Inc., Massachusetts, USA
Luminata Crescendo Western HRP substrate	Millipore GmbH, Schwalbach
Master-Mix DyNAmo <sup>™</sup> Flash Probe PCR Kit	New England Biolabs GmbH, Frankfurt
Rneasy Mini Kit	Quiagen, Hilden
Roti <sup>®</sup> -Quant universal	Carl Roth GmbH, Karlsruhe
Tri-Reagent (peqGOLD TriFast <sup>™</sup> )	Peqlab, Erlangen

## 2.7 Lösungen/Puffer

Alle benötigten Chemikalien wurden gemäß den Erfordernissen in bidestilliertem Wasser (aqua bidest.) gelöst.

Lösungen/Puffer	Zusammensetzung
<b>ECL Lösung (Lösung A)</b>	200 ml 0,1 M Tris-HCl (pH: 8,6) 50 mg Luminol Lagerung bei 4-6°C und unter Lichtschutz
<b>ECL Lösung (Lösung B)</b>	11 mg para-Cumarsäure 10 ml DMSO Lagerung bei Raumtemperatur und unter Lichtschutz
<b>Lysispuffer für Proteine (<i>in-vitro</i>-Versuche)</b>	Tris-HCl (50 mM, pH: 7,5) 0,4383 g NaCl (150 mM) 0,012 g EDTA (2 mM) 0,5 ml Triton-X 100 (1%) 0,5 ml NP 40 (1%) 50 ml aqua bidest. 1 x Tablette Protease-Inhibitor cocktail (Roche)
<b>Lysispuffer für Proteine (<i>in-vivo</i>-Versuche)</b>	<u>Extraktionspuffer I:</u> 120 mM NaCl 50 mM Tris (pH: 8,0) 1 x Tablette Protease-Inhibitor cocktail (Roche) <u>Extraktionspuffer II:</u> 120 mM NaCl 50 mM Tris (pH: 8,0) 1% Triton X-100 1% NP 40 1 x Tablette Protease-Inhibitor cocktail (Roche)

## Material und Methoden

---

<b>PBS-Puffer</b>	137,5 mM NaCl 2,7 mM KCl 8,6 mM Na <sub>2</sub> HPO <sub>4</sub> 1,5 mM KH <sub>2</sub> PO <sub>4</sub> 0,1% Triton X-100
<b>Stripping-Lösung</b>	100 mM β-Mercaptoethanol (700µl) 2% SDS (10 ml einer 20% SDS Lösung) 65,5 mM Tris (6,55 ml 1 M Tris) Auffüllen auf 100 ml mit aqua bidest. pH: 6.4
<b>TBS-T Puffer (10 fach)</b>	87,66 g NaCl (1,5 M)
<b>Waschlösung für Western Blot</b>	12,114 g Tris (0,1 M) 5 ml Tween 20 1 l aqua bidest. pH: 8,0
<b>Tris/HCl Lösung</b>	12,144 g Tris 500 ml aqua bidest. pH: 8,6
<b>Zitrat-Puffer</b>	10 mM Zitronensäure Monohydrat (2-Hydroxypropan-1,2,3-tricarboxylsäure Monohydrat) pH: 6

## 2.8 Medien für eukaryontische Zellkulturen

Zelllinien	Zusammensetzung
Medium für PANC-I, COS <sub>wt</sub> -, MzChA1-, MzChA2-Zellen	<u>DMEM</u> + 100 µg/ml Streptomycin + 100 U/ml Penicillin + 1% L-Glutamin + 10% FCS
Medium für SH-SY5Y <sub>wt</sub> -, CHO <sub>wt</sub> -Zellen	<u>DMEM/F12</u> + 100 µg/ml Streptomycin + 100 U/ml Penicillin + 1% L-Glutamin + 10% FCS + 1% MEM NEAA
Medium für SW480-, LoVo-, T84-, CaCo-2, BxPC3-, CFPAC-1-, Capan-2-, NTera-2-, NCCIT-, TCam-2-, PC-3-, LNCaP- und DU-145-Zellen	<u>RPMI 1640</u> + 100 µg/ml Streptomycin + 100 U/ml Penicillin + + 1% L-Glutamin + 10% FCS
Medium für <i>transfizierte</i> CHO-Zelllinie: CHO APP751 <sub>wt</sub>	<u>DMEM/F12</u> + 100 µg/ml Streptomycin + 100 U/ml Penicillin + 1% L-Glutamin + 10% FCS + 1% MEM NEAA + 200 µg/ml G418
Medium für <i>transfizierte</i> COS-Zelllinien: COS Mock, COS APP695 <sub>wt</sub>	<u>DMEM</u> + 100 µg/ml Streptomycin + 100 U/ml Penicillin + 1% L-Glutamin + 10% FCS + 300 µg/ml Hygromycin B

Medium für <i>transfizierte</i> Neuroblastoma	<u>DMEM/F12</u>
Zelllinien:	+ 100 µg/ml Streptomycin
SH-SY5Y Mock-, SH-SY5Y APP695 <sup>wt-</sup> ,	+ 100 U/ml Penicillin
SH-SY5Y SPA4CT-, SH-SY5Y	+ 1% L-Glutamin
SPA4CT $\Delta$ cyto-Zellen	+ 10% FCS
	+ 1% MEM NEAA
	+ 300 µg/ml Hygromycin B

## 2.9 Verwendete Zelllinien

### 2.9.1 Humane Karzinomzelllinien

Die Gallenwegstumorzelllinien stammen von Dr. T. Mansuroglu (UMG Göttingen, Abt. Gastroenterologie). Alle aufgeführten Kolon- und Pankreaskarzinomzelllinien kamen aus dem Labor von Prof. M. Ghadimi (UMG Göttingen, Abt. Chirurgie). Die verwendeten Keimzelltumorlinien stammen von PD Dr. S. Schweyer (UMG Göttingen, Abt. Allgemeine Pathologie) und die Prostatakarzinomzelllinien stammen von PD Dr. P. Thelen (UMG Göttingen, Abt. Urologie). Ebenfalls wurden Zelllysate von Glioblastom-Zelllinien untersucht, die freundlicherweise von Dr. E. Kim und Prof. A. Giese (UMG Göttingen, Abt. Neurochirurgie) zur Verfügung gestellt worden sind.

Tumorentität	Zelllinie	Beschreibung und Referenz
<b>Gallenwegstumor</b>	MzChA1	Humane cholangiozelluläre Karzinomzelllinie (Jhandier et al., 2005)
	MzChA2	Humane cholangiozelluläre Karzinomzelllinie (Serr et al., 2006)
<b>Keimzelltumor</b>	NCCIT	Humane, nicht-seminomatöse Embryonalkarzinomzelllinie (Schweyer et al., 2007; You et al., 2009) ATCC, CRL-2073

	NTERA-2/c1.D1 (NTERA-2, NT2)	Humane, nicht-seminomatöse Embryonalkarzinomzelllinie, Metastase eines Teratokarzinoms von einem 22-jährigen Kaukasier (Andrews et al., 1984), ATCC, CRL-1973
	TCam-2	Humane Seminomzelllinie, Primärkultur wurde aus dem Seminom von einem 35-jährigen Mann etabliert (Mizuno et al., 1993; Eckert et al., 2008)
<b>Kolonkarzinom</b>	CaCo2	Zelllinie aus einem primären Adenokarzinom des Kolons eines 72-jährigen Kaukasiers (1974) (Fogh et al., 1977)
	LoVo	Zelllinie, aus einem metastasierten Kolon-Adenokarzinom (linke supraklavikuläre Region) eines 56-jährigen Mannes (Drewinko & Yand, 1976)
	SW480	Humane Kolon-Adenokarzinomzelllinie von einem 50-jährigen kaukasischen Mann mit Kolonkarzinom (Grad 4, Duke Klasse B) (Leibovitz et al., 1976)
	T84	Kolonkarzinomzelllinie aus einem männlichen Patienten (Murakami & Masui, 1980)
<b>Neuroblastom</b>	SH-SY5Y	Klonale Unterlinie der Neuroepitheliomzelllinie SK-N-SH (Knochenmetastase eines Neuroblastoms von einem 4-jährigen Mädchen) (Biedler et al., 1973), DSMZ, ACC 209
<b>Pankreaskarziom</b>	BxPC-3	Humane epitheliale Pankreaskarzinomzelllinie von einer 61-jährigen Patientin (Tan et al., 1986)
	Capan-2	Humane Pankreaskarzinomzelllinie von einem 56-jährigen männlichen Patienten (Dahiya et al., 1993)
	CFPAC-1	Lebermetastase eines Pankreasadenokarzinoms von einem 26-jährigen Kaukasier (Warth & Greger, 1993)
	PANC-1	Humane Pankreas Karzinom Zell-Linie, aus einem 56-jährigen Mannes (Lieber et al., 1975)
<b>Prostatakarzinom</b>	DU-145	Humane Prostataadenokarzinom-Zelllinie, ATCC, Rockville, USA; Androgen-unabhängige Zellen (Mickey et al., 1977)

	LNCaP	Humane Prostataadenokarzinom-Zelllinie, ATCC, Rockville, USA; Zelllinie wurde aus einer Lymphknotenmetastase generiert; Androgen-abhängige Zellen (Horoszewicz et al., 1983)
	PC-3	Humane Prostataadenokarzinom-Zelllinie, ATCC, Rockville, USA; Androgen-unabhängige Zellen (Kaighn et al., 1979)
	VCaP	Spinale Prostatakarzinommetastase, Androgen-abhängige Zelllinie (Korenychuk et al., 2001)
<b>Glioblastome</b>	G112	Humane Glioblastom-Zelllinie (Kantelhardt et al., 2010)
	U87	Humane Neuronale Glioblastom (Astrozytom) Zell-Linie aus einer 44-jährigen Patientin (Ponten & Macintyre, 1968)
	U251	Humane Neuronale Glioblastom (Astrozytom)-Zelllinie aus einen männlichen 75-jährigen Patienten (Bigner et al., 1981)

### 2.9.2 Sonstige eukaryontische Zelllinien

Zelllinie	Beschreibung
COS-7 (COS)	Etablierte Fibroblasten-Zelllinie wurde 1981 aus dem Nierengewebe von Grünen Meerkatzen ( <i>Cercopithecus aethiops</i> ) gewonnen; diese wurde stabil mit einer Mutante des SV40-Virus transformiert (T-Antigen) (Gluzman, 1981)
Chinese Hamster Ovary Zelllinie (CHO)	Immortalisierte Zelllinie aus Ovarien des chinesischen Hamsters ( <i>Cricetulus griseus</i> ) (Tjio & Puck, 1958)

### 2.9.3 Stabil transfizierte eukaryontische Zelllinien

Alle SH-SY5Y Neuroblastomazelllinien wurden von Dr. O. Wirths (UMG Göttingen, Division Molekulare Psychiatrie) stabil transfiziert (Wirths et al., 2007). Die stabil-transfizierte Zelllinie CHO APP751<sub>wt</sub> wurde von Prof. E. Koo (Department of Neuroscience, University of California, San Diego, USA) zur Verfügung gestellt (Weggen et al., 2001). Die Vektoren SPA4CT und SPA4CT $\Delta$ cyto stammen von PD Dr. S. Lichtenthaler (LMU München, Adolf Butenandt Institut, Abt. Biochemie) (Dyrks et al., 1992).

Transfizierte Zelllinie	Beschreibung
CHO APP751 <sub>wt</sub>	Humane APP751 (nicht-neuronale) Isoform wurde in den pcDNA3.1 Plasmidvektor kloniert, 200 $\mu$ g/ml G418 (Selektionsantibiotikum)
COS APP695 <sub>wt</sub>	Humane APP695 (neuronale) Isoform wurde in den pCEP Plasmidvektor kloniert, 300 $\mu$ g/ml Hygromycin B
COS Mock	Exprimiert den pCEP4 Plasmidvektor (Leervektor), 300 $\mu$ g/ml Hygromycin B
SH-SY5Y APP695 <sub>wt</sub>	Humane APP695 Isoform wurde in den pCEP Plasmidvektor kloniert, 300 $\mu$ g/ml Hygromycin B

SH-SY5Y Mock	Exprimiert den pCEP4 Plasmidvektor (Invitrogen), 300 µg/ml Hygromycin B (Selektionsantibiotikum) zur Erhaltung einer stabilen Transfektion
SH-SY5Y SPA4CT	Exprimiert das Konstrukt pCEP4/SPA4CT, N-terminale Deletion (C99-Fragment), 300 µg/ml Hygromycin B, (Dyrks et al., 1988)
SH-SY5Y SPA4CTΔcyto	Exprimiert das Konstrukt pCEP4/ SPA4CTΔcyto, N- und C-terminale Deletion, 300 µg/ml Hygromycin B

## 2.10 Synthetische RNA-Oligonukleotide

Die synthetischen siRNA-Oligonukleotide wurden von PD Dr. Jens Schmidt (UMG Göttingen, Abt. Neurologie) zur Verfügung gestellt und wurden von der Firma Ambion Applied Biosystems (Texas, USA) bezogen. Zur spezifischen Runterregulation der APP Expression wurden Silencer<sup>®</sup>-Select-validated-siRNA (D)-Oligonukleotide (s1500) verwendet. Die Spezifität der siRNA wurde durch einen TaqMan<sup>®</sup> Gen Expression Assay von der oben genannten Firma validiert. Details dieser Methodik und den daraus resultierten Ergebnisse sind unter: [http://www5.appliedbiosystems.com/tools/shared/pages/validation.php?sima=s1500&geneid=351&procedureid=5&refSeq=NM\\_201414](http://www5.appliedbiosystems.com/tools/shared/pages/validation.php?sima=s1500&geneid=351&procedureid=5&refSeq=NM_201414) zu finden. Als Negativkontrolle wurde eine Zufallssequenz (*scrambled sequence, random siRNA*) gleicher Oligonukleotidlänge verwendet. Die Methodik und das Funktionsprinzip der siRNA werden detailliert im Kapitel 2.16.8 und Kapitel 2.16.9 besprochen. Die Lagerung der Oligonukleotide erfolgte in RNase freiem Wasser bei -20°C. Die entsprechenden Sequenzen der siRNA-Oligonukleotide sind wie folgt:

**Silencer<sup>®</sup> Select validated siRNA s1500 (humanes APP)**

**Erster Strang (Sense Sequenz):**

5'-CAAGGAUCAGUUACGGAAATT-3'

**Zweiter Strang (Antisense Sequenz):**

5'-UUCCGUAACUGAUCCUUGGT-3'

## 2.11 Synthetische DNA-Oligonukleotide für quantitative *real-time*-PCR-Experimente

Die validierten synthetischen Oligonukleotid-Primer für die quantitativen *real-time* PCR-Analysen wurden von der Firma Qiagen (QuantiTect Primer Assays, Qiagen, Hilden) bezogen. Die Details über die entsprechenden Sequenzen für APP,  $\beta$ -actin, GAPDH und HSPA5 (GRP78) liegen beim Anbieter vor und können unter <http://www.qiagen.com/default.aspx> angefragt werden. Die Sequenzen der Oligonukleotid-Primer für das Referenzgen ARP (*acidic ribosomal protein*) sind in der Arbeit von Stettner et al. zu finden (Stettner et al., 2007). Die Methodik der *real-time* PCR wird im Kapitel 2.15.3 besprochen.

**2.12 Verwendete primäre Antikörper für immunhistochemische Analysen**

<b>Antikörper (Klon)</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Referenz</b>
<b>APLP2 (D2-II)</b>	Kaninchen	Calbiochem/ Merck, Darmstadt	1:1000	(Thinakaran et al., 1995)
<b>APP (22C11)</b>	Maus	Millipore, Schlieren	1:250 – 1:600	(Yasuoka et al., 2004)
<b>APP (23850)</b>	Kaninchen	Gerd Multhaupt, Universität Berlin, Abt. Biochemie	1:500	(Christensen et al., 2008)
<b>GRP78/BiP (ab21685)</b>	Kaninchen	Abcam, Cambridge England	1:300	(Zwang et al., 2009)
<b>HDAC 1 (ab19845)</b>	Kaninchen	Abcam, Cambridge England	1:500	(Montgomery et al., 2009)
<b>HDAC 2 [Y461] (ab32117)</b>	Kaninchen	Abcam, Cambridge England	1:5000	(Montgomery et al, 2009)
<b>HDAC3 [Y415] (ab32369)</b>	Kaninchen	Abcam, Cambridge England	1:500	(Knutson et al., 2008)
<b>NANOG (H-155)</b>	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology, Kalifornien, USA	1:200	(Santagata et al., 2007)
<b>Oct-3/4 (C-10)</b>	Maus	Santa Cruz Biotechnology, Kalifornien, USA	1:50	(Hoei-Hansen et al., 2006)
<b>Sox2 (AF2018)</b>	Ziege	R&D Systems, Wiesbaden- Nordenstadt	1:200	(Sonne et al., 2010)

**2.13 Verwendete primäre Antikörper für Western-Blot-Analysen**

<b>Antikörper (Klon)</b>	<b>Herkunft</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verdünnung</b>	<b>Referenz</b>
<b>AFP (EP1016Y)</b>	Kaninchen	Epitomics, Kalifornien, USA	1:10.000	-
<b>Androgen- rezeptor (Ab-2) (Cat No.: RB-1358-P1)</b>	Kaninchen	Neomarker, Kalifornien, USA	1:2000	-
<b>Anti-acetyl- Histone H4 (Cat. # 06- 866)</b>	Kaninchen	Millipore, Schlieren	1:2000	(Kwon et al., 2002; Ecke et al., 2009; Venkataramani et al., 2010)
<b>APLP2 (D2-II)</b>	Kaninchen	Calbiochem/ Merck, Darmstadt	1:5000	(Kuan et al., 2006; Venkataramani et al., 2010)
<b>APP (22C11)</b>	Maus	Millipore, Schlieren	1:1000	(Hilbich et al., 1993; Venkataramani et al., 2010)
<b>APP (23850)</b>	Kaninchen	Gerd Multhaupt, Universität Berlin, Abt. Biochemie	1:100	(Borchardt et al., 1999)
<b>APP/A<math>\beta</math> (W-02)</b>	Maus	The Genetic Company/ Millipore, Schlieren	1:5000	(Ida et al., 1996; Venkataramani et al., 2010)
<b>EGFR (1005) sc-03</b>	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology , Kalifornien, USA	1:200	(Repetto et al., 2007)
<b>GRP78/BiP (C50B12)</b>	Kaninchen	Cell Signaling Technology, USA	1:1000	(Venkataramani et al., 2010)
<b>HDAC 1 (ab19845)</b>	Kaninchen	Abcam, Cambridge England	1:500	(Rashid et al., 2009)

<b>HDAC 2 [Y461] (ab32117)</b>	Kaninchen	Abcam, Cambridge England	1:2000	(Bhaskara et al., 2008)
<b>HDAC3 [Y415] (ab32369)</b>	Kaninchen	Abcam, Cambridge England	1:5000	-
<b>HSP70 (C45G5)</b>	Kaninchen	Cell Signaling Technology, USA	1:500	-
<b>NANOG (H-155) sc-33759</b>	Kaninchen	Santa Cruz Biotechnology , Kalifornien, USA	1:200	(Salmina et al., 2010)
<b>Oct-3/4 (C-20) sc-8629</b>	Ziege	Santa Cruz Biotechnology , Kalifornien, USA	1:200	(Lee et al., 2006)
<b>Pan-CK (AE1/AE3)</b>	Maus	DAKO, Hamburg	1:500	(Hale & Markert, 2004)
<b>Sox2 (ab59776)</b>	Kaninchen	Abcam, Cambridge England	1:1000	(Singhal et al., 2010)
<b><math>\beta</math>-actin (AC-74)</b>	Maus	Sigma- Aldrich, Deisenhofen	1:5000	(Fu et al., 2003)

### 2.13.1 Charakterisierung der APP-Antikörper durch Western-Blot-Analysen

In dieser Arbeit wurden drei verschiedene APP-Antikörper verwendet. Der monoklonale Antikörper W-02 wurde in Western-Blot-Analysen verwendet. Dieser Antikörper erkennt das Epitop an den Aminosäurepositionen 5-8 der A $\beta$ -Sequenz (Ida et al, 1996). Für die immunhistochemischen Analysen wurde der monoklonale Antikörper 22C11 und der polyklonale Antikörper 23850 verwendet. Der letztere Antikörper wurde auch in immunzytochemischen Analysen benutzt. Der 22C11 Antikörper bindet an das Peptid epitop 66-81 der APP-Sequenz und der polyklonale 23850 ist gegen die Aminosäurereste 18-491 vom humanen APP gerichtet (Hilbich et al, 1993; Borchardt et al, 1999). Zur

Charakterisierung der Spezifität dieser Antikörper erfolgten zunächst Western-Blot-Analysen mit Zelllysaten von APP-überexprimierenden und Mock-transfizierten SH-SY5Y Neuroblastoma-Zellen. Mit allen Antikörpern konnte eine typische Doppelbande zwischen 110 und 130 kDa detektiert werden. Dabei repräsentierte die untere Bande die unreife Form des APP (nur N-glykosyliert), und die obere Bande die post-translational modifizierte APP-Form (N- und O-glykosyliert, tyrosyl-sulfatiert) (Weidemann et al., 1989). Die Western Blot Analysen sind im Kapitel 6.1. dargestellt.

#### 2.14 Verwendete sekundäre Antikörper für Immunhistochemie und Western-Blot-Analysen

<b>HRP (<i>horse radish peroxidase</i>)-konjugierte Sekundärantikörper</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verdünnung</b>
Kaninchen-anti-Ziege Immunglobulin IgG	DAKO, P0449, Dänemark	1:2000
Ziege-anti-Kaninchen Immunglobulin IgG	DAKO, P0448, Dänemark	1:3000
Ziege-anti-Maus Immunglobulin IgG	DAKO, P0447, Dänemark	1:4000

<b>AP (<i>Alkalische Phosphatase</i>)-konjugierte Sekundärantikörper</b>	<b>Hersteller</b>	<b>Verdünnung</b>
Dako REAL Detection System, Alkaline Phosphatase/RED	DAKO, K5005, Dänemark	Ready-to-use (sofort einsetzbar)
EnVision+ Dual Link System-HRP	DAKO, K4061, Dänemark	Ready-to-use (sofort einsetzbar)
Pferd-anti-Ziege Immunglobulin IgG, biotinyliert	Vector Laboratories, Burlingame, USA	1:200

## **2.15 Molekularbiologische Methoden**

### **2.15.1 Isolierung, Konzentrations- und Reinheitsbestimmung von Ribonukleinsäure (RNA) aus Zellkulturen**

Die Isolierung der RNA, die reverse Transkription (RT), als auch die quantitative *real-time*-PCR, wurden hauptsächlich in SW480-, BxPC-3, NCCIT und NTERA-2 Zelllinien durchgeführt. Dafür wurden entsprechende Zelllinien mit 5 mM VPA oder frischem Medium (Kontrolle) für 24 h stimuliert. Die Extraktion der RNA erfolgte nach zwei verschiedenen Techniken:

#### **Technik 1:**

Die Gesamt-RNA wurde mit Hilfe des Tri-Reagents (peqGOLD TriFast™) der Firma Peqlab (Erlangen) nach dem Protokoll des Herstellers durchgeführt. Die Konzentration von Nukleinsäuren wurde mit einem UV-Spektralphotometer (Eppendorf Biophotometer, Hamburg) gemessen. Nach einer Abgleichung der Nullwerte konnte das Absorptionsmaximum bei 260 nm bestimmt werden. Gleichzeitig konnte auch eine potentielle Verunreinigung durch Proteine bei 280 nm vermessen werden. Die Reinheit der RNA wurde durch das A260/A280- Verhältnis wiedergegeben. Diese lag im Durchschnitt zwischen 1,6 und 2,0. Die Ausbeute an RNA lag zwischen 0,6 – 1,5 µg/µl. Die Proben wurden bis zur weiteren Analyse bei -80°C verwahrt.

#### **Technik 2:**

Die folgende Technik wurde im Labor von PD Dr. P. Thelen (UMG Göttingen, Abt. Urologie) durchgeführt.

Dabei erfolgte die Isolierung von RNA aus Zellkulturen mit Hilfe des Mini RNA Isolation II Kit™ (Zymo Research, Freiburg). Anschließend erfolgte die weitere Analyse mit dem Agilent Bioanalyser 2100 und einem RNA 600 Nano LabChip-Kit (Agilent Technologies, Waldbronn). Bei einem Probeneinsatz von 1 µl (ungefähr 5ng RNA) konnte eine Aussage über die Quantität und die Qualität der RNA getroffen werden.

### 2.15.2 Reverse Transkription (RT)

Um eine repräsentative Menge von cDNA (*complementary DNA*) aus der Gesamt-RNA zu erhalten wurde das Fermentas First Strand cDNA Synthesis Kit (#K1611 und #K1612, Thermo Fisher Scientific) verwendet. Die cDNA-Erststrangsynthese erfolgte mit der Moloney Murine Leukemia Virus-Reversen Transkriptase (MMLV-RT) und Hexanukleotiden (oligo-(dT)-Primer), die sich mit den poly (A)<sup>+</sup>-Sequenzen der mRNA paaren. Dadurch entsteht der cDNA Strang, der zur mRNA komplementär ist und später DNA-abhängigen Polymerasen zugänglich gemacht werden kann. Für einen Standard PCR Reaktionsansatz mit einem Gesamtvolumen von 20 µl wurden zunächst 2 µg Gesamt-RNA, 2µl Hexanukleotid-Primer, 2µl MMLV-RT, 1µl RiboLOCK RNase Inhibitor und RNase-freies Wasser miteinander vermischt und herunter zentrifugiert. Mit Hilfe eines Thermocyclers wurden die Proben revers transkribiert (5 min bei 25°C, 60 min bei 37°C und für weitere 5 min bei 70°C). Danach wurden die Proben auf Eis abgekühlt und entweder bei -20°C verwahrt oder weiter aufgearbeitet.

### 2.15.3 Quantitative *real-time* (RT) PCR-Analysen

Als *real-time* (RT) PCR wird ein PCR-Verfahren bezeichnet, bei dem während der PCR die Menge der entstandenen Produkte in Echtzeit gemessen wird. Die Messung der Produktzunahme geschieht anhand von Fluoreszenzlicht, welches in Abhängigkeit von der Produktmenge emittiert wird. Der Cyaninfarbstoff SYBR<sup>®</sup>-Green (Qiagen, Hilden) wurde hierbei verwendet. Dieser Farbstoff interkaliert weitgehend sequenzunspezifisch mit der doppelsträngigen DNA. Das gebundene SYBR<sup>®</sup>-Green fluoresziert nach Anregung etwa 1000-fach stärker als in seiner freien Form. Daher bietet dieser Farbstoff eine hervorragende Möglichkeit um die neu generierte Doppelstrang-DNA (dsDNA) sichtbar zu machen (Morrison et al., 1998). In Gegenwart von 480 nm (blau) lässt sich in dsDNA interkaliertes SYBR<sup>®</sup>-Green anregen und zeigt ein Emissionsmaximum bei 520 nm. Die RT-PCR Analysen wurden im 384-well Maßstab mit dem Stratagene MX3000P Real-Time Cyler (Waldbronn) durchgeführt. Integriert ist ein ladungsempfindliches Detektionssystem mit der die Fluoreszenz jeder Probe, die durch an dsDNA gebundenes SYBR<sup>®</sup>-Green emittiert wurde, gemessen werden kann. Die entsprechenden Reaktionsansätze enthielten spezifische Oligonukleotid-Primer, den DyNAmo<sup>™</sup> Flash Probe PCR-Master-Mix und den ROX-

Farbstoff. Der PCR-Master-Mix enthielt die HotStarTaq-DNA-Polymerase in einem optimierten Puffer, dNTP-Mix (mit dUTP-Additiv) und den SYBR<sup>®</sup>-Green-I Fluoreszenz-Farbstoff. Der ROX-Farbstoff sollte die Korrektur minimaler Abweichungen erlauben, die durch Pipettier-Ungenauigkeiten oder Fluoreszenz-Schwankungen entstehen können und diente so als passive Referenz. Die Menge des Master-Mixes ergab sich aus der Anzahl der cDNA-Proben und einer zusätzlichen Master-Mix-Kontrolle (Ausschluss eventueller Verunreinigungen). Bei fünf cDNA-Proben wurde dementsprechend ein sieben-facher Ansatz angesetzt. Der Gesamt-Ansatz für 2 µl einer 1:5 verdünnten cDNA setzte sich wie folgt zusammen:

### **Einfachansatz**

10 µl Master-Mix

2 µl spezifische Primer

5,85 µl RNase-freies Wasser

0,15 µl ROX

Die PCR-Reaktion umfasste drei aufeinander folgende Schritte, die in 40 Zyklen wiederholt wurden. Im ersten Schritt wurde der PCR-Ansatz auf 94°C erhitzt und dadurch die DNA in Einzelstränge aufgeteilt (Denaturierung). Der nächste Schritt wurde bei 55°C durchgeführt, damit sich die spezifischen Primer an die komplementären Stränge der Matrizen-DNA anlagern konnten (*Annealing*). Beim dritten Schritt der PCR wurde der entsprechende DNA-Abschnitt synthetisiert (Elongation). Dafür wurde eine Taq-Polymerase (aus *Thermus aquaticus*, Taq) verwendet. Diese zeichnet sich durch ausgesprochene Thermoresistenz aus und kann auch bei Temperaturerhöhungen auf 95°C stabil bleiben. Die PCR beginnt am freien 3'-Ende des angelagerten Primers mit der Synthese in 5'-3'-Richtung. Die für diesen Schritt beigefügten dNTPs wurden dem Reaktionsansatz zu Beginn beigefügt (Master-Mix). Nach 30 Sekunden erfolgte wieder eine Erhitzung auf 94°C. Die während der Synthese neu entstandenen DNA-Abschnitte wurden wieder getrennt und konnten dadurch erneut als Matrize für den nächsten Zyklus zur Verfügung stehen. Dadurch konnte während der Zyklen ein exponentieller Anstieg der PCR-Produkte nachgewiesen werden. Um auszuschließen, dass unspezifische Produkte auftreten, wurde nach Abschluss der Amplifikationsphase eine Schmelzkurvenanalyse durchgeführt. Dabei wurde kontinuierlich die Fluoreszenz bei steigender Temperatur gemessen. Folgendes Programm wurde für alle Primer verwendet:

Temperatur	Zeit	Beschreibung	
95°C	10 min	Aktivierung der Taq	
<b>94°C</b>	<b>15 sec</b>	<b>Denaturierung</b>	<b>40 Zyklen</b>
<b>55°C</b>	<b>30 sec</b>	<i>Annealing</i>	
<b>72°C</b>	<b>30 sec</b>	<b>Elongation</b>	
95°C	1 min		
60°C	30 sec		
95°C	2°C/min	Schmelzkurve	

Die damit generierten Ergebnisse wurden anschließend in eine Excel-Tabelle exportiert.

Die Ergebnisse wurden mit Hilfe der *Relative-Expression-Software-Tool* (REST) V2.0.7 ausgewertet. Dadurch konnten die Expressionsunterschiede zwischen behandelten Zellen und Kontrollen berechnet und statistisch ausgewertet werden. Die REST-Software fasst die Gruppen als Mittelwerte zusammen und berechnet daraus die mittleren Expressionsunterschiede der Gruppen, normalisierte über ein bestimmtes *house-keeping* Gen (GAPDH,  $\beta$ -actin oder ARP), sowie die Varianzen der einzelnen Expressionen. Die Ergebnisse wurden statistisch getestet und die Expressionsunterschiede in einem Ausgabefenster mit ihren Signifikanzen ausgegeben (Pfaffl et al, 2002). Die entsprechenden Ergebnisse wurden als Balkendiagramme mit Hilfe der GraphPad Prism version 5.00 Software (GraphPad Software, Inc., 2007) wiedergegeben.

#### 2.15.4 Microarray-Analysen

Die in dieser Arbeit gezeigten Microarray-Analysen wurden von PD Dr. Schweyer (UMG Göttingen, Abt. Pathologie) in Auftrag gegeben und von der DNA Microarray Facility (UMG Göttingen, Transkriptomanalyselabor) von Dr. G. Salinas-Riester und Dr. L. Opitz durchgeführt und analysiert. In dieser Arbeit werden die Ergebnisse einer Valproat-Stimulation in der Ntera-2 Zelllinie beschrieben. Eine Auswertung der Genexpressionsanalyse beschränkte sich auf ausgewählte Pluripotenzgene und Linien-spezifischen Differenzierungsmarker. Insgesamt wurden hier 65 Gene aufgeführt, die im Labor von PD Dr. Schweyer durch RT-PCR-Analysen validiert wurden. Mit Genehmigung

von PD Dr. Schweyer wurden die Ergebnisse in einem Wasserfall-Diagramm (*Waterfall-Plot*) dargestellt.

## **2.15.5 Proteinchemische Techniken**

### **2.15.5.1 Isolierung von Gesamt-Protein aus Zellkulturen**

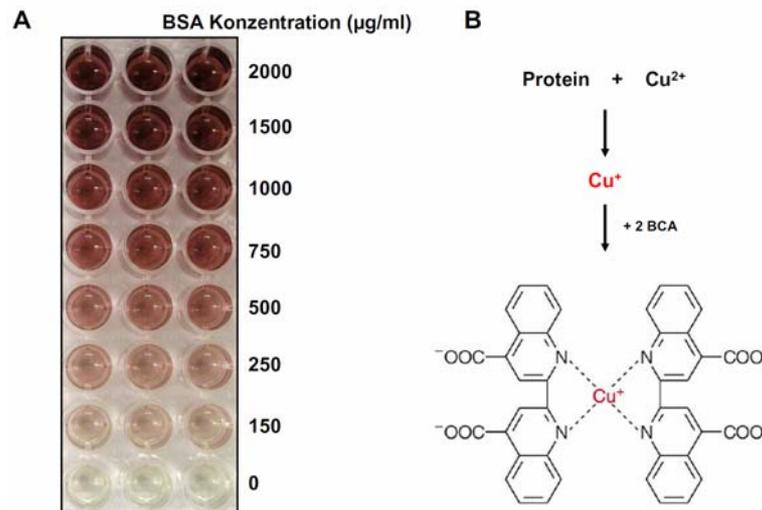
Nachdem das Medium abgesaugt worden ist, wurden die Zellen zweimal mit eiskaltem PBS gewaschen, um den Zelldetritus zu entfernen. Bei Bedarf wurde das Medium zur weiteren Analyse bei -80°C aufbewahrt. Nachdem erneut 5 ml PBS hinzugefügt worden ist, wurden alle adhärenen Zellen mit einem sterilen Zellschaber geerntet, abzentrifugiert und das verbliebene Pellet mit „Lysis-Puffer für *in-vitro*-Versuche“ versetzt. Entsprechend der Größe der Pellets wurde 150 – 300 µl Lysis-Puffer verwendet. Nach 30 - 45 minütiger Inkubation auf Eis wurde die Suspension bei 5000 x rpm für 10 min (bei 4°C) zentrifugiert. Der die Zellproteine enthaltende Überstand wurde in ein sauberes Eppendorf-Gefäß überführt und in geeigneten Aliquots (50-100 µl) bei -20°C aufbewahrt.

### **2.15.5.2 Isolierung von Gesamt-Protein aus implantierten Xenograft-Tumoren**

Zur Isolierung des Proteins wurde den Tumoren ihrem Gewicht entsprechend Extraktionspuffer I (für *in-vivo*-Versuche) im Verhältnis 1:8 – 1:9 hinzugefügt. Die Tumore wurden homogenisiert und in eine Suspension überführt. Danach wurde diese für 20 min bei 17.000 x rpm (4°C) abzentrifugiert. Der Überstand (lösliche Proteinfraction) wurde bei -20°C aufbewahrt. Das Pellet wurde erneut mit Extraktionspuffer II (für *in-vivo*-Versuche und Triton-X-100 Zusatz) verwendet und mit einem Ultraschallhomogenisator sonifiziert bis erneut eine trübe Zellsuspension entstanden war. Nach erneuter Zentrifugation bei 10.000 x rpm für 2 min wurde der Überstand (der aufgeschlossene Proteine enthielt) in saubere Eppendorf-Gefäße aliquotiert und die nicht löslichen Bestandteile (Pellet) bei -80°C aufbewahrt.

### 2.15.5.3 Konzentrationsbestimmung von Proteinen

Die Proteinkonzentration in Gesamtlisaten wurde mit Hilfe des Roti<sup>®</sup>-Quant universal Kit nach Angaben des Herstellers gemessen. Dieses Verfahren kombinierte den Biuret-Assay mit Bicinchoninsäure (BCA) und beruht auf der von Smith et al. (1985) entwickelten Methode (Smith et al., 1985). Von Redinbaugh et al. (1986) wurde diese auf das Mikrotiterplatten-Format angepasst (Redinbaugh & Turley, 1986). Das Grundprinzip dieser Methode ist wie folgt: Proteine reduzieren im alkalischen Milieu  $\text{Cu}^{2+}$  zu  $\text{Cu}^+$  (Biuret-Reaktion). Das  $\text{Na}^+$ -Satz der Bicinchoninsäure ist in der Lage mit  $\text{Cu}^+$  in alkalischer Lösung einen intensiv purpurfarbenen Komplex einzugehen und kann damit photometrisch detektiert werden. Das Absorptionsmaximum dieses Komplexes liegt bei 503 nm und verhält sich proportional zur Proteinkonzentration der Probe. Mittels einer Kalibrationsreihe (Eichgerade) aus BSA (Rinderserumalbumin) festgelegter Konzentrationen (0 bis 2000  $\mu\text{g/ml}$ ) konnte die Proteinkonzentration der Probe festgestellt werden (Abb. 2.1).



**Abb. 2.1:** Colorimetrische Proteinkonzentrationsbestimmung durch den Biuret-Assay mit BCA. (A) Kalibrationsreihe mit aufsteigenden BSA Konzentrationen (bis 2000  $\mu\text{g/ml}$ ) nach einer Inkubationsdauer von 30 min bei 37°C. (B) Chemische Biuret-Reaktion mit Bicinchoninsäure (BCA).

Die Proteinbestimmung erfolgte in flachbödigen 96-well Mikrotiterplatten. Die entsprechenden Proteinlysate wurden zunächst 1:5 mit aqua bidest. verdünnt. Je 100  $\mu\text{l}$  der Arbeitslösung wurde zu der BSA-Standardreihe als auch den verdünnten Proben hinzugefügt. Nach kurzem Schütteln wurde die 96-well Platte für 30 min bei 37°C inkubiert. Die Messung der Extinktion erfolgte mit einem  $\mu\text{Quant}$  Mikroplatten-Spectrophotometer (BioTek Instruments) bei 492 nm und wurde mit der Software Mikrowin 2000, Version 4.04 (Mikrotek

Laborsysteme) ausgewertet. Alle Lysate wurden dreifach gemessen und die resultierenden Werte gemittelt.

#### **2.15.5.4 Western Blot**

Beim Western Blot (auch Immunoblot genannt) wird zunächst das Proteinlysate mittels Gelelektrophorese aufgetrennt, im Anschluss auf eine Membran transferiert („*blotting*“) und das gewünschte Protein schließlich mittels Primär- und Sekundärantikörper nachgewiesen (Towbin et al., 1979). Durch diese Methode ist es möglich das gesuchte Zielprotein samt zugehörigem Molekulargewicht aus einer komplexen Proteinmischung zu detektieren. Die einzelnen Schritte werden nachfolgend erläutert.

#### **2.15.5.5 SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese (SDS-Page)**

Bei der SDS-Polyacrylamidgelelektrophorese wandern Proteine in einem angelegten elektrischen Feld durch die Poren einer Polyacrylamid-Gelmatrix. Die Methode nach Laemmli beschreibt eine eindimensionale, diskontinuierliche Gelelektrophorese mit dem Detergenz Natriumdodecylsulfat (SDS) (Laemmli, 1970). Durch die Verwendung von aufeinander abgestimmten Gelen und Pufferlösungen (pH: 7,0) wird zum einen die Stabilität der Proteine, als auch der Gele gefördert. Dies resultiert in einer besseren Trennschärfe und einer höheren Nachweisempfindlichkeit der Proteine. Das SDS dient dazu, die Eigenladung der Proteine zu überdecken, sodass die Auftrennung lediglich aufgrund des Molekulargewichts der Proteine erfolgt. Das Proteinlysate wandert zunächst durch ein Sammelgel (geringe Acrylamid-Konzentration) mit großen Poren, um anschließend im Trenngel (hohe Acrylamid-Konzentration) aufgetrennt zu werden. Letzteres wirkt wie ein Sieb, sodass die Proteine in Abhängigkeit von der Acrylamidkonzentration aufgetrennt werden. Bei der Probenvorbereitung der Lysate wird SDS im Überschuss hinzugefügt (SDS-Probenpuffer). Dadurch verbinden sich die Proteine mit dem SDS zu negativ geladenen SDS-Protein-Komplexen mit konstantem Masse/Ladungs- Verhältnis. Zudem bewirkt das SDS eine Denaturierung der Proteine, wodurch sie ihre Quartär-, Tertiär- und teilweise ihre Sekundärstruktur verlieren und als Polypeptid eine nahezu einheitliche Form annehmen.

Zur Auftrennung der Proteine wurden Gradientengele (VarioGel 4-12% Bis-Tris Gel, 1.0 mm, 10 und 15 Bahnen, Anamed-Elektrophorese) verwendet. Die Proteinproben wurden zunächst mit SDS-Probenpuffer (VarioGel SDS-Probenpuffer, 2-fach Konzentrat) im Verhältnis 1:1 versetzt. Alle Proben wurden für 3-5 min bei 95°C mittels eines Thermocyclers erhitzt und auf Eis gelegt. Nach kurzem Abzentrifugieren wurden die Proben auf das Gel aufgetragen. Als Proteinstandard wurde der Spectra Color Broad Range Marker (Fermentas) mit aufgetragen. Die Elektrophorese erfolgte unter Verwendung des VarioGel Laufpuffers (Anamed-Elektrophorese) für 15 min bei 60 V und anschließend für 45 min bei 150-180 V.

### **2.15.5.6 Western-Blot-Analysen von Proteinen auf Nitrozellulose-Membranen**

Im Anschluss an die Gelelektrophorese wurden die Proteine meist zur weiteren Analyse mittels Elektrobplot auf eine Membran transferiert, wobei das Muster der elektrophoretischen Auftrennung dabei erhalten bleibt. Die Übertragung auf die Membran konnte dann mittels Semi-dry- oder Wet-Blot (Tank-Blot) erfolgen. Nach eigenen Erfahrungen zeigte sich das Wet-Blot-Verfahren als vorteilhaft, da insbesondere niedermolekulare Proteine gut darstellbar waren. Daher wird im Folgenden nur diese Methodik beschrieben.

Nach Abschluss des Gellaufs wurde das Gel, die Nitrozellulose-Membran (Amersham Hybond-ECL Membrane), als auch zurecht geschnittene Filterpapiere (Trans-Blot) für 3-5 min in Transfer-Puffer (Anamed-Elektrophorese) äquilibriert und danach der Blot wie folgt zusammengebaut (Sandwich-Methode, von oben nach unten): 2 Wet-Blot-Schwämmchen, 1 Filterpapier, ECL-Membran, 1 Filterpapier, 2 Schwämmchen. Dieser Stapel wurde zwischen zwei Elektrodenplatten einer Wet-Blot-Apparatur eingesetzt und mit Transfer-Puffer getränkt. Danach wurden die Elektroden so angeschlossen, dass unten die Anode und oben die Kathode positioniert war. Somit konnten die Proteine im elektrischen Feld vom Gel zur Membran wandern. Der Transfer wurde für 90 -120 min bei 4°C und 25 mV durchgeführt. Nach dieser Prozedur wurde die Apparatur auseinander gebaut und die Membran in TBS-T (1-fach) kurz gewaschen. Um den Erfolg des Transfers zu überprüfen wurde anschließend die Membran kurz in Ponceau S (0,1 % Ponceau S in 5 % Essigsäure, Carl Roth GmbH, Karlsruhe) geschwenkt. Ponceau S bindet unspezifisch an hydrophobe Proteine mit einer Nachweisgrenze bei ca. 50 ng Protein/Gelspur. Um unspezifische Bindungsstellen abzublocken, wurde die Membran in 1-facher TBS-T Lösung mit 10% (v/w)

Magermilchpulver und danach über Nacht bei 4°C mit entsprechenden Primärantikörpern inkubiert.

#### **2.15.5.7 Detektion der Proteine**

Nach zweimal 5-minütigem Waschen in 1-facher TBS-T Lösung wurden entsprechende HRP-konjugierte Sekundärantikörper in einer Verdünnung 1:2000 – 1:4000 für 2 h bei Raumtemperatur inkubiert. Die Proteine wurden über Chemilumineszenz nachgewiesen. Hierbei wurde eine frische Arbeitslösung aus zwei Bestandteilen zusammengeführt. 8 ml Luminol-Lösung (in Tris-HCl gelöst; Lösung A) wurde mit 800 µl Lösung B (para-Cumarsäure in DMSO) und 2,4 µl H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> vermischt und gut vermischt. Die HRP (Sekundärantikörper) setzt das Substrat der Arbeitslösung um. Die Produkte bilden ein lichtemittierendes Präzipitat um den Antigen-Antikörperkomplex. Durchschnittlich wurde die Membran für 2 min in der Arbeitslösung inkubiert. Anschließend wurde die Membran in eine Filmkammer gelegt. In der Dunkelkammer wurden Röntgenfilme (CEA) verwendet um die emittierenden Signale sichtbar zu machen. Je nach Intensität der Banden schwankte die Entwicklungszeit zwischen 2 sec und 5 min. Neben dieser Arbeitslösung wurde auch ein kommerzielles ECL-(*Enhanced chemiluminescence*)-Kit (Luminata Crescendo Western HRP substrate) verwendet.

#### **2.15.5.8 Strippen der Nitrozellulose-Membran**

Für den Nachweis eines weiteren Proteins wurde der Primärantikörper mit einer *Stripping*-Lösung entfernt. Dabei wurde die Membran für 45 Minuten in *Stripping*-Puffer inkubiert. Anschließend wurde diese dreimal mit TBS-T gewaschen, bevor die Membran mit einem weiteren Antikörper inkubiert worden ist. Ein weiterer Blockierungsschritt mit Milchpulver erwies sich als nachteilhaft und wurde deshalb nicht durchgeführt.

### **2.15.5.9 Metabolische Markierung von Zellen/*Pulse-Chase* Experimente**

Die metabolische Markierung von Zellen und nachfolgende *Pulse-Chase* Experimente wurden im Labor von J. Walter (Universität Bonn, Abt. Molekulare Neurodegeneration) von I. Tamboli durchgeführt und werden daher nur zusammengefasst dargestellt.

Für *Pulse-chase* Experimente wurden SW480-Zellen bei 37°C in Methionin/Cystein- und Serum freien Medium für 45 min kultiviert. Anschließend erfolgte die Markierung mit [35S]Methionin/[35S]Cystein (MP Biomedicals Inc.) für 10 min. Nach zweimaligem Waschen mit PBS wurde normales serumhaltiges Medium hinzugefügt. Die Analyse der Zellen als auch des Mediums fand zu indizierten Zeitpunkten statt. Dabei wurden die Zellen mit Hilfe eines STEN-Puffers (50 mM Tris, pH7.6, 150 mM NaCl, 2 mM EDTA, 1 % NP-40/1 % Triton X-100, 2% BSA) für 10 min lysiert und für 20 min bei 14000 x g abzentrifugiert. Die Immunpräzipitation wurde mit dem APP-Antikörper 5313 für 2 h bei 4°C durchgeführt. Anschließend wurde eine Western-Blot-Analyse durchgeführt (Tamboli et al., 2005).

## **2.16 Zellbiologische Methoden**

### **2.16.1 Kultivierung eukaryontischer Zellen**

Alle in Kapitel 2.9 aufgeführten Zelllinien wurden in wassergesättigter Atmosphäre unter 5% CO<sub>2</sub> bei 37°C in einem HERAccl 150 CO<sub>2</sub> Incubator (Thermo Fisher Scientific Inc.) kultiviert. Medien und Lösungen wurden, soweit nicht anders angegeben, auf 37°C vorgewärmt. Das Medium wurde alle zwei Tage erneuert. In Abhängigkeit von der Wachstumsrate der Zellen wurden diese ein- bis zweimal pro Woche geteilt. Dabei wurden die Zellen mit D-PBS (Pan Biotech GmbH) gewaschen und mit 3-5 ml Trypsin (PAN Biotech GmbH) bei 37°C inkubiert. Wenn sich die Zellen vom Boden der Kulturflasche gelöst haben (mikroskopische Kontrolle), wurde die Zellsuspension mit frischem Medium versetzt, wodurch die Trypsinaktivität gestoppt wurde. Anschließend wurde diese für 5 min bei 1000 x rpm abzentrifugiert. Es wurden 1:2 – bis 1:10- Verdünnungen der Zellsuspension in frischem Medium hergestellt.

### **2.16.2 Kryokonservierung und Revitalisierung eukaryontischer Zellen**

Für die Kryokonservierung wurden Zellen trypsiniert, im Zellkulturmedium aufgenommen und für 5 min bei 1000 x rpm abzentrifugiert. Nach dem Absaugen des Mediums wurden die Zellen in Einfriermedium (10% DMSO in Zellkulturmedium) resuspendiert und jeweils 1 ml davon in Kryoröhrchen überführt und für 3 – 7 Tage bei -80°C und zur Langzeitkonservierung anschließend in flüssigen Stickstoff aufbewahrt.

Zur Revitalisierung von Zellen wurden Kryoröhrchen im Wasserbad (37°C) aufgetaut und in vorgewärmtes Kulturmedium überführt. Nach Zentrifugation für 5 min bei 1000 x rpm wurde das Zellpellet mit frischem Medium resuspendiert und für 48 – 72h bei 37°C im Inkubator aufbewahrt. Anschließend wurde nach mikroskopischer Kontrolle das Medium ausgetauscht.

### **2.16.3 Zellzahlbestimmung**

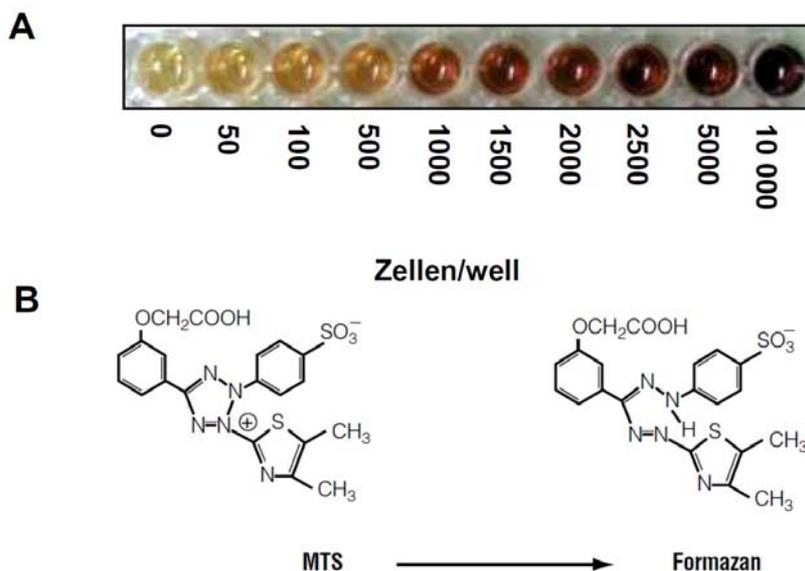
Die Bestimmung der Zellzahl erfolgte in einer Neubauer-*improved* Zählkammer (LO - Laboroptik GmbH) nach Färbung mit Trypanblau (Sigma-Aldrich).

### **2.16.4 Bestimmung der sAPP $\alpha$ -Konzentration im Kulturmedium**

Zur Bestimmung der sAPP $\alpha$ -Konzentration im Zellkulturüberstand wurde zunächst 2 ml Medium für 1 min bei 17.000 x rpm zentrifugiert. Damit konnten die verbliebenen Zelldetritusbestandteile entfernt werden. Anschließend wurde das Medium unter Verwendung der Amicon Ultra-4 (Millipore) Filterröhrchen für 5 min bei 4000 x rpm zentrifugiert. Damit war nicht nur das Medium stark aufkonzentriert, sondern auch alle Proteine die kleiner als 30-50 kDa sind nahezu eliminiert. Der aufbereitete Überstand (ca. 50  $\mu$ l) wurde in frische Eppendorf-Gefäße überführt und bis zur weiteren Analyse bei -80°C aufbewahrt.

### 2.16.5 Proliferationsassay

Zur Überprüfung des Wachstums und der Viabilität von Zellen unter verschiedenen experimentellen Konditionen wurde der Cell Titer 96<sup>®</sup>-A<sub>Q<sub>ueous</sub>-Non-Radioactive-Cell-Proliferationsassay (Promega) verwendet (Abb. 2.2).</sub>



**Abb. 2.2:** Bestimmung der Proliferation mit dem Cell Titer 96<sup>®</sup>-A<sub>Q<sub>ueous</sub>-Non-Radioactive-Cell-Proliferationsassay. (A) In einer 96-well Platte wurden aufsteigend höhere Zellzahlen pipettiert und anschließend mit 20 µl Proliferationsassay versetzt. Nach 2 h Inkubation bei 37°C konnte ein zellzahlabhängiger Farbgradient nachgewiesen werden. (B) Chemische Umwandlung von MTS (Owen's Reagenz) in intensiv gefärbte Formazanderivate unter reduzierenden Bedingungen (mitochondriale Reduktasen) (Promega, 2005; S. 2).</sub>

Der Proliferationsassay stellt eine etablierte Methode zu Bestimmung von Viabilität und Zellproliferation dar und kann ebenso zur Quantifizierung zytotoxischer/zytostatischer Aktivität Anwendung finden. Dieser Assay besteht aus einer Tetrazolium-Verbindung (3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-5-(3-carboxymethoxyphenyl)- 2-(4-sulfophenyl)-2H-tetrazolium; MTS) und Phenazin-Ethosulfat (PES). Das PES bindet Elektronen und erhöht die chemische Stabilität von MTS. Durch mitochondriale Dehydrogenasen (NADPH und NADH) metabolisch aktiver Zellen, wird MTS in ein Formazan-Reaktionsprodukt modifiziert, was in einen Farbumschlag resultiert.

Diese Reduktion erfordert intakte Mitochondrien, die nach Absterben der Zelle innerhalb weniger Minuten inaktiv werden. Daraus ergibt sich eine Unterscheidungsmöglichkeit zwischen lebenden und abgestorbenen Zellen.

Nach Ermittlung der Zellzahl wurden 5000 Zellen/well (100  $\mu$ l Medium) in eine frische 96-well Platte ausgesät und für 24 h bei 37°C und 5 % CO<sub>2</sub> im Inkubator aufbewahrt. Bei pharmakologischen Experimenten wurden Zellen mit aufsteigenden Konzentrationen behandelt und für weitere 24 h im Brutschrank inkubiert. Zur Bestimmung der Proliferation wurden am nächsten Tag jeweils 20  $\mu$ l MTS-Assay pro Well hinzugefügt. Nach kurzem Schütteln wurde die 96-well Platte für weitere 2 h im Inkubator aufbewahrt. Die Messung des Farbumschlags des Chromophors erfolgte in einem Mikrotiterplatten-Lesegerät (ELISA-Reader;  $\mu$ Quant Mikroplatten-Spektrophotometer, Biotech Instruments). Die Absorption wurde bei 490 nm gegen 650 nm (Referenzwellenlänge zum Abzug des Hintergrunds) gemessen. Alle Experimente wurden mindestens vier- bis sechsmal durchgeführt. Aus den Daten wurden der Mittelwert und die Standardabweichung ermittelt.

### **2.16.6 LDH-Messung mittels Zytotoxizitätsassay**

Mit Hilfe des Proliferationassays kann die Anzahl an lebenden (viablen) Zellen ermittelt werden. Es erlaubt jedoch keine Unterscheidung zwischen überlebenden Zellen und Zellen, die durch Proliferation neu entstanden sind. Weiterhin kann durch den Assay, bei pharmakologischen Experimenten die Zytotoxizität von Substanzen ermittelt werden. Um zwischen Zellen die lediglich nicht proliferieren (Zytostase) und Zellen, die durch Nekrose zugrunde gegangen sind, zu unterscheiden, eignet sich die Messung von LDH (Laktatdehydrogenase). LDH wird aus zerstörten Zellen freigesetzt und kann im Zellkulturmedium nachgewiesen werden. In den Kulturen, in denen die Zellen lediglich in ihrer Proliferation stagnieren (Wachstumsarrest), findet sich keine LDH-Aktivität im Kulturmedium. Die LDH-Aktivität wurde mit dem CytoTox96<sup>®</sup>-Non-Radioactive-Cytotoxicity-Assay (Promega) untersucht. Hierbei bewirkt freigesetztes LDH in einer enzymatischen Reaktion, die Konversion eines Tetrazolium-Salzes in ein rotes Formazan-Produkt. Die Menge an neu entstandenen Formazan verhält sich proportional zu der Anzahl an zerstörten (lysierten) Zellen.

Wie auch bei den Proliferationsanalysen wurden 5000 Zellen/well für 24 h mit diversen Substanzen inkubiert. Anschließend wurde vom Kulturüberstand 50  $\mu$ l entnommen und mit

50 µl des Substrat-Mixes sowie 50 µl Assay-Puffers in einer frische 96-well Platte vermennt. Nach kurzem Schütteln wurde die 96-well Platte unter Lichtschutz für 30 min bei Raumtemperatur aufbewahrt. Als Positivkontrolle wurden entweder Zellen mit 15 µl Lysis-Puffer (9% (v/v) Triton-X 100 in aqua bidest.) aufgeschlossen oder ein äquivalentes Volumen an frisch erstellter LDH Positivkontrolle (2 µl LDH Positivkontrolle in 10 ml PBS + 1 % BSA (Rinderalbumin)) verwendet. Die enzymatische Umwandlung des Tetrazolium-Salzes in ein rotes Formazan-Produkt wurde anschließend durch 50 µl Stop-Lösung beendet. Die Absorption des Reaktionsproduktes wurde bei 490 nm im ELISA-Reader (µQuant Mikroplatten-Spektrophotometer, Biotech Instruments) gemessen.

### 2.16.7 Indirekte Immunfluoreszenz

Um die Menge und Lokalisation von Proteinen (APP,  $\beta$ -actin) sowie morphologische Alterationen festzustellen, wurden Zellen immunzytochemisch gefärbt und untersucht. Dabei wurden jeweils 5 - 20 x 10<sup>3</sup> Zellen in Lab-Tek™ 4-well chamber slides (Thermo Fischer Scientific) überführt. Nach einer Inkubationsdauer von 3 Tagen wurde eine Konfluenz von 40 – 60 % erreicht. Nach mehrmaligem vorsichtigem Waschen mit D-PBS und unter mikroskopischer Kontrolle wurden die Zellen zunächst mit eiskaltem Methanol für 6 min bei -20°C fixiert. Dadurch wurde ein Ausfließen des Zellinhalts größtenteils verhindert. Nach erneutem dreimaligem Waschen mit D-PBS wurden die Zellen für 5 min mit 0,5% Triton-X 100 (in D-PBS) permeabilisiert. Anschließend wurden die Zellen mit einer Blockierungslösung (10% FCS + 4 % (v/w) Milchpulver in D-PBS) für 1 h blockiert. Danach erfolgte die Inkubation mit entsprechenden Primärantikörpern für mindestens 18 h bei 4°C. Folgende Primärantikörper wurden verwendet:

Primäre Antikörper	Verdünnung
APP Antikörper: 22C11 (Millipore, Maus monoklonal)	1:100
APP Antikörper: 23850 (Gerd Multhaup, Kaninchen polyklonal)	1:100 – 1:500
$\beta$ -actin (Sigma, Maus monoklonal)	1:1000

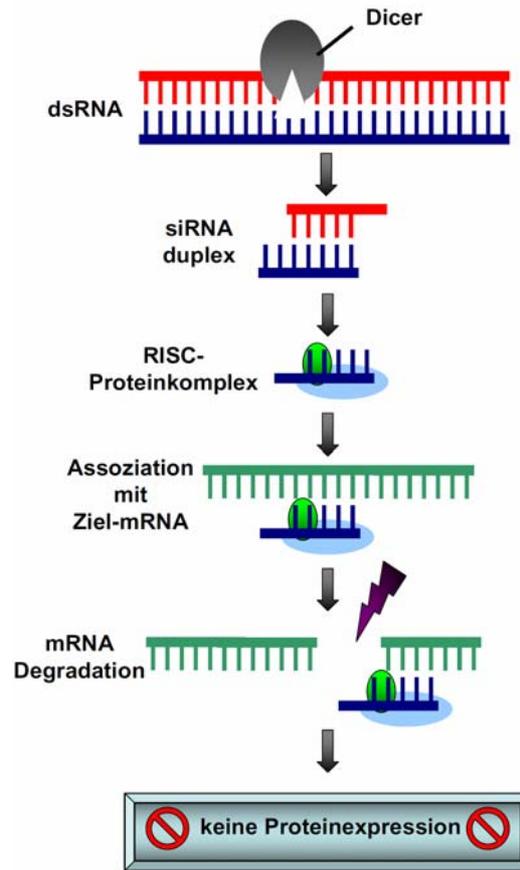
Am nächsten Tag wurden die Zellen zweimal mit D-PBS gewaschen und mit anschließend mit entsprechenden Sekundärantikörpern unter Lichtschutz für 2 h inkubiert. Dabei wurden folgende Sekundärantikörper verwendet:

Sekundäre Antikörper	Verdünnung
Alexa Fluor 488 (Invitrogen, anti-Maus, grün)	1:300
Alexa Fluor 568 (Invitrogen, anti-Kaninchen, rot)	1:300

Danach wurden die Chamber-Slides auseinander gebaut und erneut dreimal mit D-PBS gewaschen. Nach einer 45 sec langen Inkubation in DAPI (Sigma, 1,5 mg/l in aqua bidest.) wurden die Objektträger mit Antifade-Medium (Invitrogen) eingedeckt. Zur Langzeitaufbewahrung wurden alle Objektträger unter Lichtschutz bei -4°C aufbewahrt. Eine Analyse der Präparate erfolgte mit dem Olympus Bx51/DP50 Mikroskop (Olympus Cooperation).

### 2.16.8 Herunterregulation der Genregulation mittels RNA-Interferenz (RNAi)

Es eignen sich verschiedene Methoden, um die Funktion eines Proteins zu charakterisieren. Eine etablierte Methode ist die RNA-Interferenz (RNAi). Die Verwendung von doppelsträngiger RNA (dsRNA) wird verwendet, um spezifisch mRNAs für eine Degradation zu markieren. Dadurch wird selektiv die Expression der entsprechenden Gene verringert (*knock-down*). Im ersten Schritt wird die dsRNA in 21-23 Nukleotide *small-interfering-RNAs* (siRNA) geteilt, welche auch als *guide RNAs* bezeichnet werden (Hammond et al., 2001). Das Dicer-Enzym, welches Mitglied der RNase III-Familie der dsRNA-spezifischen Ribonukleasen ist, prozessiert ATP-abhängig die dsRNA in kleinere 19-21 bp-Duplexe (siRNAs) (Hutvagner & Zamore, 2002). Diese siRNA binden an einen Nuklease-Komplex mit dem sie zusammen das so genannte RISC (*RNA-inducing-silencing-complex*) bilden. Das ATP-abhängige Entwinden der siRNA-Duplexe führt zur Aktivierung des RISC. Aktiviert geht dieser gezielt gegen homologe Transkripte durch Basenpaarung vor. Dies führt zur zielgerichteten Degradation der mRNA und verhindert dadurch die Expression des Gens (Abb. 2.3).



**Abb. 2.3: Übersicht über den Mechanismus der RNA-Interferenz (RNAi).** Das Dicer-Enzym zerschneidet dsRNA in kleinere Fragmente (~22-Nukleotide). Diese werden als siRNA bezeichnet. Die siRNAs komplexieren mit der Multikomponenten-Nuklease RISC. Eine Aktivierung des RISC wird durch die Entwindung der dsRNA induziert. Der aktivierte RISC verwendet die entwundene siRNAs als Schablone und paart sich mit der homologen Ziel-RNA. Die Folge ist eine selektive Degradation der mRNA und führt zu einer Verhinderung der Proteinexpression. Diese Abbildung ist modifiziert nach Rutz & Scheffold, 2004 (S. 79).

### 2.16.9 Transfektion eukaryontischer Zellen mit siRNA

Hierfür wurden Zellen nach 24 h trypsinisiert und in 6-well Platten ausgesät. Bei der Transfektion mit siRNA wurde das Transfektionsreagenz Lipofectamine 2000<sup>®</sup> von Invitrogen verwendet, wodurch stabile Komplexe zwischen Lipiden und Oligonukleotiden gebildet werden. Dadurch können siRNA-Moleküle effizient in Zellen aufgenommen werden. Zur spezifischen Runterregulation der APP Expression wurden Silencer<sup>®</sup>-Select-validated siRNA (D)-Oligonukleotide (s1500) verwendet (Kapitel 2.10). Als adäquate Kontrollexperimente wurden eine nicht-inaktivierende siRNA (nicht homologe Sequenzen, *Random* siRNA) verwendet und dazu eine reine Mediumkontrolle mitgeführt. Die *Random*-siRNA diente dazu, die Möglichkeit eines unspezifischen „Gene-Silencing“-Effekts

auszuschließen. Dieser Effekt könnte durch exogen eingebrachte Nukleinsäuren und durch verwendete Transfektionsreagenzien ausgelöst werden (Elbashir et al., 2002).

Für die Transfektion wurden Zellen in 6-well Platten ausgesät und bis zu einer Konfluenz von 30-50% im Brutschrank inkubiert. 1-2 h vor der eigentlichen Transfektion wurde das Medium durch 2 ml Opti-MEM Medium ausgetauscht. Die siRNA-Stammlösung betrug 50  $\mu\text{Mol/L}$  (50 pMol/ $\mu\text{l}$ ). 2  $\mu\text{l}$  Duplex-siRNA (100 pMol/2.1ml = 47,6 nM) wurde zu 48  $\mu\text{l}$  Opti-MEM Medium hinzugefügt (siRNA-Ansatz). Gleichzeitig wurde 5  $\mu\text{l}$  Lipofectamine 2000<sup>®</sup> zu 50  $\mu\text{l}$  Opti-MEM Medium pipettiert (Lipofectamine-Ansatz). Beide Ansätze wurden vermengt, kurz geschüttelt und für 20 min bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurde das Gemisch tröpfchenweise in das Medium gegeben. Nach 4-6 h wurde das Medium durch normales Medium ausgetauscht. 48 h nach Transfektion wurden die Zellen lysiert und die Transfektionseffizienz durch Western-Blot-Analysen untersucht.

### 2.17 Tierexperimentelle Methoden

Das Ntera-2-Xenograft-Mausmodell, als auch die *in vivo* Behandlung mit Valproat wurde unter Supervision von PD Dr. S. Schweyer von K. Thiele und Dr. C-L. Behnes (UMG Göttingen, Abt. Pathologie) durchgeführt. Der entsprechende Tierversuchsantrag mit der Referenznummer 33.11.42502-04-058/07 liegt bei PD Dr. S. Schweyer vor. Die direkt nach dem Abtöten der Mäuse entnommenen Tumore wurden zunächst in flüssigem Stickstoff eingefroren und bis zur weiteren Aufbereitung bei  $-80^{\circ}\text{C}$  aufbewahrt. Die aufgeführte Zusammenfassung dient dem besseren Verständnis der gewonnenen Ergebnisse.

In der Therapiestudie wurden 6-Wochen alte immundefiziente Mäuse (Charles River, BALB/c-*nude*) verwendet. Dieses Mausmodell zeichnet sich durch das Fehlen jeglicher Behaarung und dem Fehlen des Thymus aus. Damit besitzen diese Tiere keine gereiften T-Zellen und können keine Immunantwort gegenüber Fremdgewebe entwickeln. Alle Tiere wurden im Tierstall der Pathologie (UMG Göttingen) in Makrolonkäfigen bei zwölfstündigem Hell-Dunkel-Zyklus gehalten. Trockenpellets sowie Trinkwasser standen den Tieren *ad libitum* zur Verfügung. Ntera-2-Zellen wurden mittels Trypsin aus den Kulturflaschen abgelöst, in PBS gewaschen und dann wurde eine Verdünnung von  $1 \times 10^6$  Zellen/100  $\mu\text{l}$  erstellt. Jeweils 100  $\mu\text{l}$  Zellsuspension wurden mit 100  $\mu\text{l}$  Matrigel (Becton Dickinson, Heidelberg) gemischt und in die Flanke injiziert. Anschließend wurden die Tiere

in drei Kohorten mit jeweils 15 Mäusen aufgeteilt. Der Gesundheitszustand der Tiere wurde anhand des Gewichtes und der Tumorgröße überwacht. Das Tumolvolumen wurde mit Hilfe einer Schublehre und nach der Formel: Länge x Breite<sup>2</sup> x 0,5 errechnet (Igawa et al., 2002). In der Therapiestudie wurde das Antiepileptikum Valproat (Orfiril<sup>®</sup>, Desitin, Hamburg) verwendet und in einer Konzentration von 400mg/kg KG/Tag den Tieren oral via Trinkwasser appliziert.

### **2.18 Patientenmaterial**

#### **2.18.1 Pankreas- und Kolonkarzinome**

Für die retrospektiven Studien wurde Gewebe von Patienten mit primären Pankreas – und Kolonkarzinomen verwendet, die im Rahmen von chirurgischen Resektionen in den Jahren 2007 - 2009 an der UMG Göttingen in der Abteilung für Allgemeine Chirurgie entnommen worden sind. Die histopathologische Beurteilung der HE-(Hämatoxylin-Eosin)-Schnitte, sowie die Klassifizierung der Tumore, erfolgten unabhängig von zwei erfahrenen Pathologen. In dieser Studie stammen die drei Pankreas- und Kolonkarzinom-Präparate von PD Dr. B. Gunnawan (UMG Göttingen, Abt. Gastropathologie) und wurden von PD Dr. S. Schweyer (UMG Göttingen, Abt. Pathologie) nach dem aktuellen Klassifikationssystem der WHO (World Health Organisation) beurteilt (Hamilton & Aaltonen, 2000).

#### **2.18.2 Testikuläre Keimzelltumore**

Für die retrospektiven Studien mit testikulären Keimzelltumoren (*testicular germ cell tumor*, TGCT) wurden explizit Patienten ausgewählt, die vor der Operation (UMG Göttingen, Abt. Urologie) weder mit Radio-/Chemotherapie noch Immunmodulatoren therapiert worden sind. Insgesamt wurden 173 Patienten (von 2005 – 2009) begutachtet. Eine Auflistung des Patientenkollektivs ist in Tab. 2.1 ersichtlich.

<b>Testikuläre Keimzelltumore</b>	<b><i>n</i></b>
<b>Reine TGCT (einheitlicher histologischer Typ)</b>	<b>117</b>
<i>Seminome</i>	96
<i>Nicht-Seminome</i>	21
Embryonale Karzinome	15
Dottersacktumore	3
Teratome	3
<b>Mischtumoren (Zusammensetzung aus diversen Tumor Subtypen)</b>	<b>56</b>
<i>Seminome</i>	24
<i>Nicht-Seminome</i>	75
Embryonale Karzinome	38
Dottersacktumore	5
Choriokarzinome	6
Teratome	26

**Tabelle 2.1:** Aufteilung des Patientenkollektives mit testikulären Keimzelltumoren. Aufgelistet sind die verwendeten Fälle mit der entsprechenden Probenzahl und der Diagnose.

Das Patientenkollektiv der testikulären Keimzelltumoren stammt aus der Abt. Pathologie (UMG Göttingen) und wurde von Prof. H-J. Radzun und PD Dr. S. Schweyer charakterisiert. Der Tumortyp und Malignitätsgrad (Staging/Grading) aller Tumore wurde nach dem aktuellen Klassifikationssystem der WHO beurteilt (Woodward et al., 2004). Für die Studien lag ein positives Votum der Ethik-Kommission der UMG Göttingen vor.

### 2.18.3 Histologische Techniken

Die folgenden histologischen Methoden wurden in enger Zusammenarbeit mit PD Dr. S. Schweyer (UMG Göttingen, Abt. Pathologie) durchgeführt.

### **2.18.3.1 Fixierung des Gewebes**

Das frisch präparierte Material wurde direkt nach Entnahme für 24 h in 10% Formalin fixiert. Anschließend wurde das Gewebe mit Hilfe einer aufsteigenden Alkoholreihe (50%, 70%, 90% und 96%) entwässert und danach in 58°C temperiertem Paraffin eingebettet. Nach der Aushärtung des Paraffins (über Nacht) wurde der Paraffinblock entnommen und bei 4°C gelagert.

### **2.18.3.2 Herstellung der Paraffinschnitte**

Die Paraffinblöcke mit dem fixierten Gewebe wurden zu Quadern geeigneter Größe zurechtgeschnitten und für mindestens 10 min auf einer Kühlplatte (Leica EG 1140 C, Leica Vertrieb GmbH) auf 4°C abgekühlt. Danach wurden die Blöcke in das Mikrotom (Mikrotom Cool Cut, HM 335 E, MICROM International GmbH) eingespannt. Die Schnittdicke betrug 4 µm. Mit Hilfe eines feinen Pinsels wurden die Schnitte auf 60°C warmes Wasser gelegt, mit einem Objektträger aufgenommen und getrocknet. Alle Objektträger wurden über Nacht bei 37°C in einem Inkubator aufbewahrt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Schnitte bei Raumtemperatur gelagert.

### **2.18.3.3 Herstellung der Tissue Microarrays (TMA)**

Die Tissue Microarrays (TMA) wurden in der Abt. Pathologie (UMG Göttingen) von PD Dr. S. Schweyer hergestellt. Hierbei wurde das oben genannte Patientenkollektiv von testikulären Keimzelltumoren verwendet.

Die TMA-Technik erlaubt eine schnelle Sichtbarmachung von histologischen Strukturen im molekularen Bereich an einer hohen Anzahl von verschiedenen Gewebeproben zur gleichen Zeit (Moch et al., 2001). Diese Technik vereinfacht die schnelle Übertragung von molekularen Entdeckungen auf klinische Sachverhalte. Besonders vorteilhaft ist die Möglichkeit die Untersuchungen in sehr kurzer Zeit an großen Patientenkollektiven durchzuführen (*high-throughput-molecular-profiling*), die Gewebeerstörung bei der Materialgewinnung zu verkleinern, und Kosten- und Zeitaufwand zu verringern (Kallioniemi et al., 2001). Die Interpretation und Beurteilung einer großen Anzahl von Fällen wird

vereinfacht und überschaubar. Außerdem tragen die TMA zur Qualitätssicherung bei, da gleiche Antikörperkonzentrationen und bei gleicher Inkubationsdauer auf hunderte von Biopsien zeitgleich einwirken können (Hsu et al., 2002).

Nach der Fixierung des Gewebes (10%-gepuffertem Formalin) wurde als Spenderblöcke diejenigen ausgewählt, die besonders viel Tumorgewebe und wenig Bindegewebe oder nekrotisches Material enthielten. Von den ausgewählten Proben wurden frische HE- gefärbte Großflächenschnitte angefertigt und repräsentative Tumorareale, die später gestanzt werden sollten, markiert. Die Herstellung eines TMA-Blockes erfolgte manuell mit Hilfe eines Stanzgerätes und verlief in drei Schritten: 1.) Herstellung eines Loches im Empfängerblock 2.) das Ausstanzen des im Durchmesser 0,6 mm breiten Gewebezylinders aus einem Spenderblock und zuletzt 3.) das Einführen des Zylinders in das dafür vorgesehene Loch im Empfänger-Block (Kononen et al., 1998).

Insgesamt wurden alle Patientenfälle mit Keimzelltumoren auf 17 verschiedene TMAs arrangiert.

### **2.18.3.4 Immunhistochemie in Paraffingewebeschnitten**

Zunächst wurden die Gewebeschnitte mit Xylol deparaffiniert (2 x 10 min), anschließend in einer absteigenden Alkoholreihe (100% Ethanol für 5 min, 96% für 2 min und 70% für je 5 min) rehydriert und für 5 min mit aqua bidest. gespült. Danach wurden die Schnitte für 40 min in Zitrat-Puffer (pH: 6) im Dampfgerar gekocht und nach 10-minütiger Abkühlphase für 5 min unter fließend aqua bidest. gespült. Nachdem die überschüssige Flüssigkeit abgetropft wurde, folgte ein Blockierungsschritt mit 3% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> für 20 min. Danach wurde erneut unter fließend aqua bidest. gespült und die Schnitte in TBS gestellt. Nach der Umrahmung mit einem Fettstift erfolgte eine weitere Blockierung mit 10% BSA/5% FCS für 20 min. Anschließend erfolgte die Inkubation mit entsprechenden Antikörpern für 2 h bei Raumtemperatur oder bis zu 16 h (über Nacht) bei 4°C. Unspezifische Bindungsstellen wurden in TBS 2 x 2 min abgewaschen.

Als Enzyme wurden in der Immunhistochemie meistens Meerrettich-Peroxidase (HRP) und Alkalische Phosphatase (AP) mit den entsprechenden Substraten verwendet.

Für die folgenden Schritte ergaben sich zwei alternative Färbemöglichkeiten:

Färbung mit dem DAB-Chromogen (Pankreas- und Kolonkarzinome):

Der Sekundärantikörper (HRP) wurde entsprechend den Firmenempfehlungen (DAKO EnVision+ Dual Link System-HRP Rabbit/Mouse, DAKO) in TBS verdünnt. Nach einer Inkubation von 30 min wurde erneut mit TBS gewaschen und für 20 min bei Raumtemperatur mit dem DAB-Chromogen gefärbt.

Färbung mit Alkalischer Phosphatase (AP) (Testikuläre Keimzelltumore):

Bei der AP-Färbemethode fand das Dako REAL Detection System (Alkaline Phosphatase/RED, Rabbit/Mouse) der Firma DAKO Verwendung. Diese Färbung beruht auf der *Labelled*-(Strep-)-Avidin-Biotin-Methode (LSAB, markiertes Streptavidin-Biotin). Hierbei wird der biotinylierte Sekundärantikörper (Dako REAL TM Link) mit dem Dako REAL Steptavidin Alkaline Phosphatase (AP) inkubiert und anschließend die Reaktion mit dem RED Chromogen sichtbar gemacht.

Anschließend wurde diese Reaktion mit TBS abgestoppt und die Präparate in aqua bidest. gewaschen (5 min). Hierauf erfolgte eine Färbung mit Hämalaun (HE-Gegenfärbung) für 8 min. Diese wird durchgeführt um einen Kontrast gegenüber der primären Färbereaktion zu erhalten. Die Gewebeschnitte wurden anschließend für 10 min unter fließendem Leitungswasser gebläut und danach eingedeckelt.

Kontrollfärbungen unter Auslass der Inkubation mit Primär- oder Sekundärantikörpern wurden ebenfalls durchgeführt und zeigten keine spezifische Reaktion.

### **2.18.3.5 Semi-Quantifizierung durch den immunreaktiven Score**

In dieser Arbeit wurden nur die Expressionen von APP, APLP2 und GRP78 in testikulären Keimzelltumoren semi-quantifiziert. Nach immunhistochemischer Färbung wurden alle 173 Präparate bei einer 40-fachen Vergrößerung sorgsam durchgesehen. Bewertet wurden dabei die Intensität und die Menge der gefärbten Tumorzellen.

Die Intensität (Signalstärke) wurde folgendermaßen eingeteilt:

0	keine Färbung
1	schwache Färbung (+)
2	deutliche Färbung (++)
3	starke Färbung (+++)

Die Menge der gefärbten Zellen wurde prozentual folgender Einteilung vorgenommen:

0	keine Färbung
1	1 - 20 %
2	21 - 40 %
3	41 – 70 %
4	71 – 100 %

Durch Multiplizierung von Intensität und Menge an gefärbten Zellen konnte individuell für jedes Präparat der immunreaktive Score-Index (IRS) ausgerechnet werden. Die möglichen Werte des immunreaktiven Scores betragen: 0, 1, 2, 3, 4, 6, 8, 9 und 12.

## 2.19 Statistische Analysen

Die statistische Auswertung und die Diagramme dieser Arbeit wurden mit der Software GraphPad Prism version 5.00 Software (GraphPad Software, Inc., 2007) erstellt. Dazu wurden die Rohdaten mit einer *One-Way-Anova* oder *Two-Way-Anova* ausgewertet. Anschließend wurde entweder ein unpaarer *t*-test oder eine *Bonferroni-Poc-hoc*-Analyse durchgeführt. Es wurde dazu bei allen Versuchen mit  $n \geq 3$  gearbeitet und ein *p*-wert  $< 0,05$  als statistisch signifikant betrachtet (\*  $p < 0,05$ ; \*\* $p < 0,01$ ; \*\*\* $p < 0,001$ ). Beim *t*-test wurde mit einem Konfidenzintervall von 95% gearbeitet. Die Messwerte wurden dabei auf den Mittelwert und auf die entsprechende Standardabweichung der zu jedem Experiment gehörenden Kontrolle bezogen und in Relation zur Kontrolle (diese wurden entweder gleich 0 % oder 100% gesetzt) dargestellt.

## 3. Ergebnisse

Die Ergebnisse dieser Arbeit sind in zwei Kapiteln aufgeteilt, die jeweils ein komplett bearbeitetes Projekt beinhalten. Die Ergebnisse des ersten Projekts (Kapitel 3.1) sind bereits publiziert (Venkataramani et al., 2010) und stellen die Grundlage des Folge-Projekts das im Kapitel 3.2 beschrieben wird dar. Die Titel der Kapitel sind wie folgt:

3.1 Projekt I: Die Regulation des Amyloid-Vorläufer-Proteins (APP) durch den HDAC-Inhibitor VPA führt zur Inhibition des Tumorwachstums

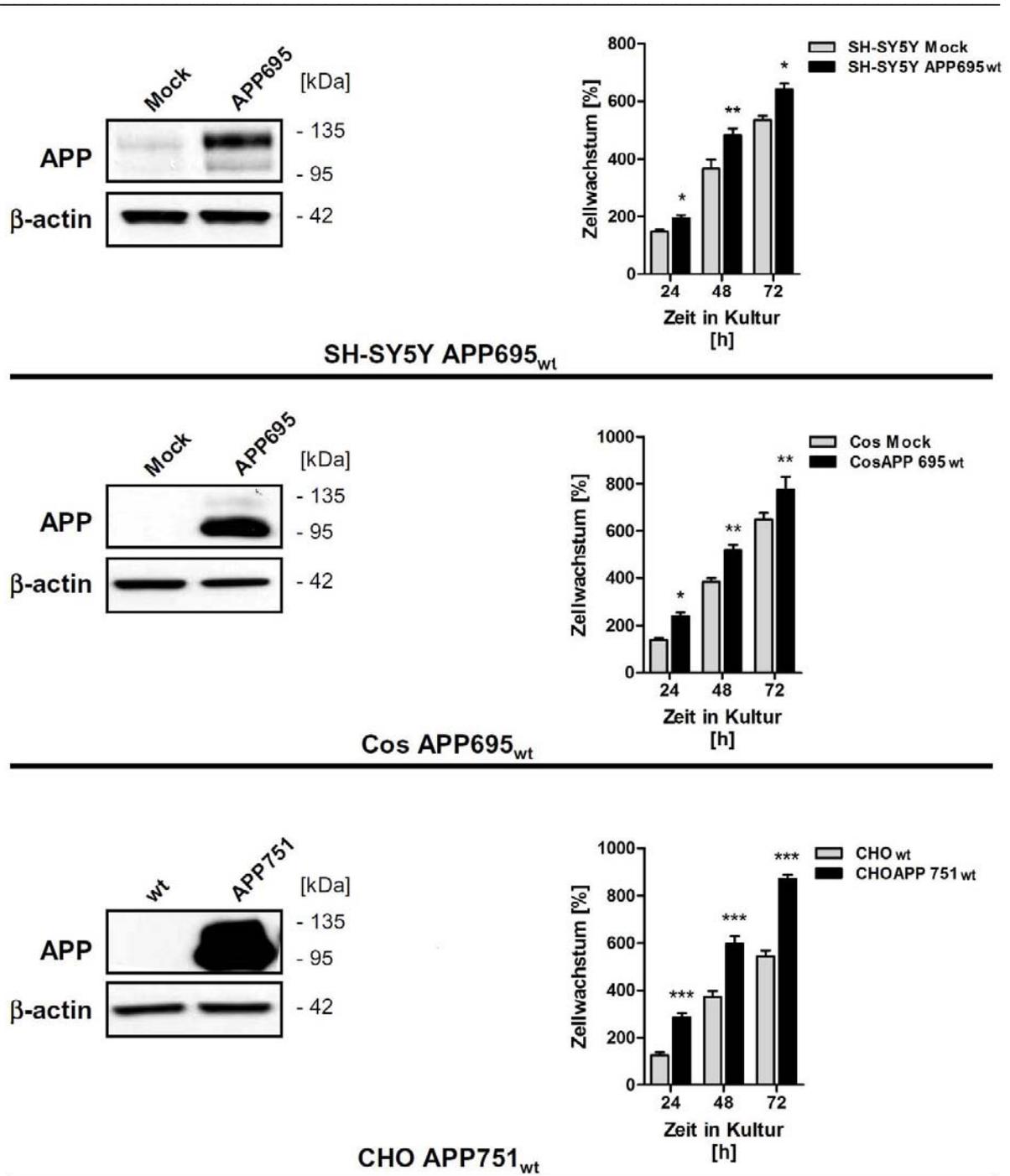
3.2 Projekt II: Das Amyloid-Vorläufer-Protein (APP) als Biomarker für transformierte, pluripotente Keimzelltumore

### **3.1 Projekt I: Die Regulation des Amyloid-Vorläufer-Proteins (APP) durch den HDAC-Inhibitor VPA führt zur Inhibition des Tumorwachstums**

#### **3.1.1 Einfluss der APP-Expression auf das Zellwachstum *in vitro***

Bereits in einer vorangegangenen Studie konnte gezeigt werden, dass eine Überexpression des APP in neuronalen Vorläuferzellen (SH-SY5Y APP695<sub>wt</sub>) mit einer Steigerung des Zellwachstums verbunden ist (Wirhth et al., 2007). Um den Einfluss vom humanen Wildtyp (wt) APP in neuronalen und in nicht-neuronalen Zelllinien zu untersuchen, wurden neben der SH-SY5Y-Zelllinie zwei weitere Zelllinien (COS- und CHO-Zelllinien) untersucht. Die COS-Zelllinie exprimiert stabil die neuronale Isoform APP695<sub>wt</sub> und die CHO-Zelllinie die nicht-neuronale Isoform APP751<sub>wt</sub>. Als Negativkontrolle dienten Mock-transfizierte COS-Zellen oder naive Wildtyp CHO-Zellen (CHO<sub>wt</sub>). Alle transfizierten Zelllinien waren kontinuierlich unter Selektionsdruck kultiviert. Mindestens sieben Tage vor Durchführung der Experimente wurden dem Medium keine Selektionsantibiotika hinzugefügt. Die zelluläre Überexpression der APP695- und APP751-Isoformen wurde durch Western-Blot-Analysen bestätigt. Hierbei wurde der monoklonale APP/A $\beta$ -Antikörper W-02 verwendet. Dementsprechend konnte nur

in humanen SH-SY5Y Zellen das endogene APP detektiert werden (Abbildung 3.2). Um zu überprüfen ob APP einen Einfluss auf die Proliferation hat wurde ein Proliferationsassay (MTS-Assay) zu drei verschiedenen Zeitpunkten (24 h, 48 h und 72 h) durchgeführt. Dafür wurden zu Beginn jeweils  $5 \times 10^3$  Zellen ausgesät und anschließend der MTS-Assay hinzugefügt (Zeitpunkt 0 h). Der Mittelwert der ermittelten Messdaten der Extinktion wurde gleich 100% (von  $5 \times 10^3$  Zellen) gesetzt. Im Vergleich zu entsprechenden Kontrollen zeigten APP-transfizierte Zelllinien zu allen Zeitpunkten eine signifikante Steigerung der Proliferationsfähigkeit. Am stärksten war dieser Effekt in CHO APP751<sub>wt</sub>-Zellen zu sehen (Abb. 3.1). Hierdurch konnte zum einen nachgewiesen werden, dass APP in diversen Säugetierzellen (neuronalen und nicht-neuronalen) als Wachstumsfaktor fungiert und zum anderen, dass jene Eigenschaft Isoform-unabhängig ist.

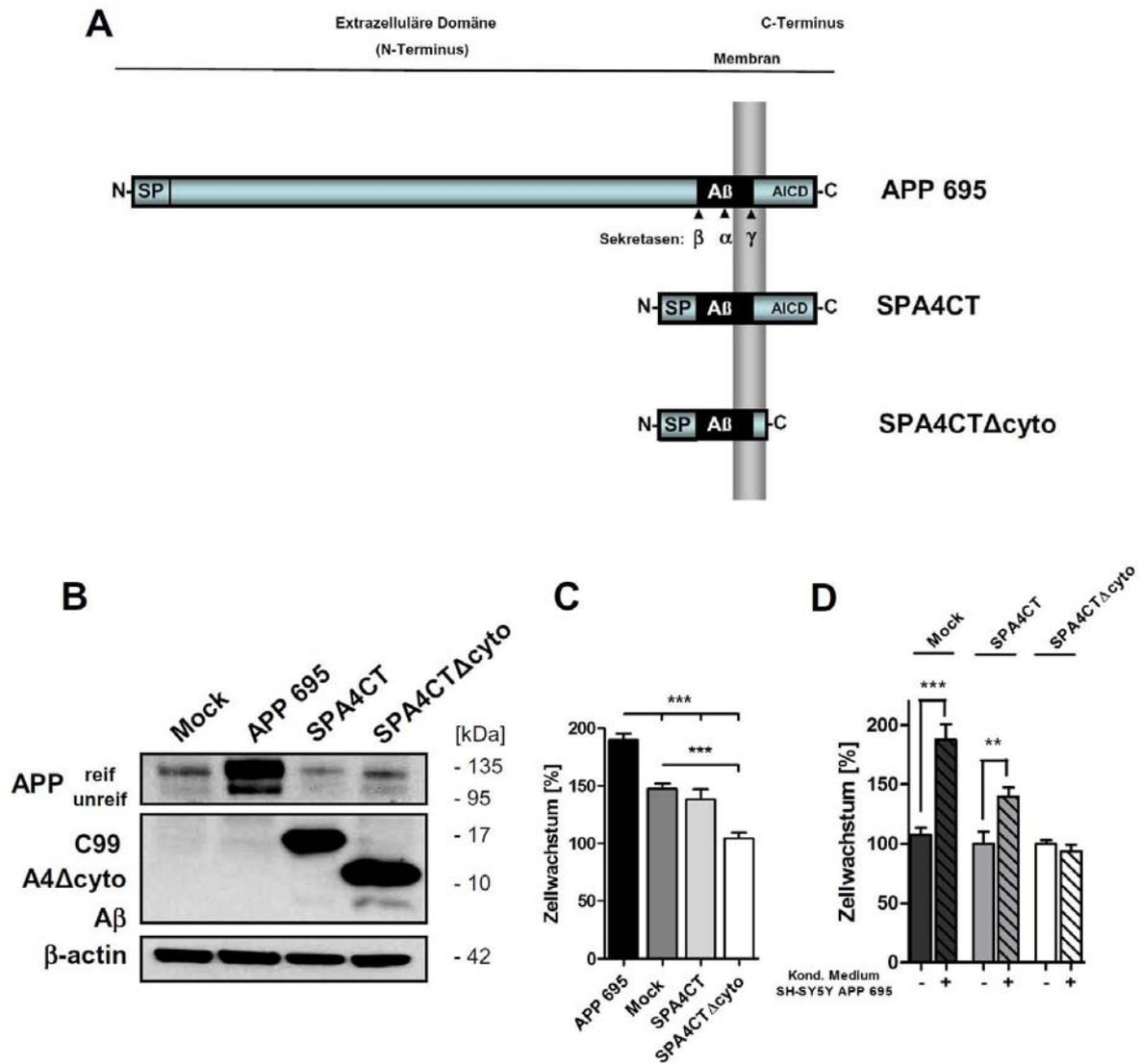


**Abb. 3.1: Einfluss des APP auf die Zellproliferation.** Drei stabil-transfizierte Zelllinien (SH-SY5Y-, COS- und CHO-Zelllinien) exprimierten entweder die neuronale Isoform (APP695<sub>wt</sub>) oder die nicht-neuronale Isoform (APP751<sub>wt</sub>). Als Negativ-Kontrolle dienen Mock-Zelllinien die nur mit dem Leervektor (pCEP4) transfiziert worden sind oder naive Wildtyp Zellen. Nach der Isolierung von Gesamt-Proteinen wurden diese über SDS-PAGE aufgetrennt und ein Western Blot mit dem APP/A $\beta$ -spezifischen Antikörper W-02 durchgeführt.  $\beta$ -actin diente zur Kontrolle gleich aufgetragener Proteinmengen. Das Wachstum der Zelllinien wurde mit dem CellTiter96<sup>®</sup>-Non-Radioactive-Cell-Proliferationassay (Promega) bestimmt. Im Gegensatz zu Mock- und Wildtyp Zellen präsentierten APP-transfizierte Zellen zu allen Zeitpunkten eine signifikant gesteigerte Proliferation. Die Resultate sind aus sechs Individualergebnissen und als Mittelwert mit entsprechendem Fehler der Standardabweichung wiedergegeben (mean  $\pm$  SEM; standard error of the mean). Entsprechende Signifikanzen wurden durch eine one-way-ANOVA mit nachfolgender Bonferroni-post-hoc-Analyse errechnet (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ).

### 3.1.2 Die N-terminale Domäne des APP ist essentiell für die wachstumsfördernde Funktion

Um die wachstumstimulierende Funktion des APP weiter zu untersuchen wurden zwei weitere APP-Deletionskonstrukte (SPA4CT und SPA4CT $\Delta$ cyto) verwendet. Beim SPA4CT-Konstrukt ist das Signalpeptid vom APP direkt mit dem N-Terminus des C99-Fragments via Dipeptid Leucin-Glutamin Linker fusioniert (Dyrks et al., 1992). Beim SPA4CT $\Delta$ cyto-Konstrukt ist das gleiche Signalpeptid direkt mit dem N-Terminus der A $\beta$ -Sequenz fusioniert. Daher ist beim SPA4CT-Konstrukt der komplette N-Terminus und beim SPA4CT $\Delta$ cyto sowohl der N- als auch der C-Terminus vom APP deletiert. Beide Konstrukte wurden stabil in SH-SY5Y-Zelllinien transfiziert. Der Erfolg der stabilen Transfektion wurde durch Western Blot-Analysen bestätigt. Hierbei wurde der W-02 Antikörper verwendet, der sowohl APP, das Prozessierungsprodukt C99 (A4CT) als auch spezifisch A $\beta$  detektieren kann. Im Gegensatz zu APP695<sub>wt</sub>-Zellen waren beide Deletionskonstrukte nicht in der Lage sAPP (*soluble* APP, sekretiertes, lösliches APP) zu produzieren und ins Medium zu sekretieren (Daten nicht gezeigt). Zuerst wurde das Wachstum der Deletionskonstrukte im Vergleich zu APP695<sub>wt</sub>- und Mock-transfizierten Kontrollen verglichen. Dafür wurde wie üblich der MTS-Assay verwendet. Die SH-SY5Y APP695<sub>wt</sub>-Zellen präsentierten das stärkste Wachstum ( $43 \pm 4,8\%$  verglichen zu Mock-Kontrollen). N-terminal deletierte SPA4CT- als auch die SPA4CT $\Delta$ cyto-exprimierenden SH-SY5Y-Zellen, zeigten keine signifikant erhöhte Proliferation als Mock-negativ Kontrollen. Interessanterweise präsentierten die SPA4CT $\Delta$ cyto-Zellen im Vergleich zu Mock-Kontrollen eine signifikante Wachstumsinhibition. Dies ist am ehesten auf die Sekretion und intrazelluläre Akkumulation von toxischen A $\beta$ -Peptiden zurückzuführen.

Im nächsten Experiment wurde das Medium von SPA4CT, SPA4CT $\Delta$ cyto und Mock-Zellen durch konditioniertes Medium von SH-SY5Y APP695<sub>wt</sub> Zellen ausgetauscht. Als Kontrolle wurden die entsprechenden Zellen mit serumfreiem Medium behandelt. Hier zeigte sich, dass sAPP $\alpha$  signifikant das Wachstum von Mock ( $76 \pm 13,3\%$ ) und SPA4CT ( $40 \pm 7,5\%$ ) steigern konnte. Hingegen konnte die exogene Addition von sAPP $\alpha$  keinen Effekt in SPA4CT $\Delta$ cyto-Zellen auslösen (Abb. 3.2).



**Abb. 3.2: Die N-terminale Domäne ist essentiell für die wachstumsfördernde Funktion von APP.** (A) Schematische Darstellung der Domänenstruktur der verwendeten APP-Konstrukte (APP695<sub>wb</sub>, SPA4CT, SPA4CTΔcyto). Die Aβ-Domäne ist in schwarz hervorgehoben. Ebenfalls sind die Schnittstellen der α-, β- und γ-Sekretase eingezeichnet. Beim SPA4CT-Konstrukt ist der gesamte N-Terminus bis zum Beginn der Aβ-Sequenz deletiert. Beim SPA4CTΔcyto-Konstrukt sind sowohl der N- als auch der C-Terminus (beinhaltet die AICD, APP intracellular domain) deletiert. (B) Die Western-Blot-Analysen bestätigten die stabile Expression der entsprechenden Konstrukte. (C) Im Gegensatz zu APP-überexprimierenden Zellen, zeigten die Deletionskonstrukte keinen signifikanten Einfluss auf das Zellwachstum. (D) Exogene Addition von sAPPα konnte sowohl in Mock-Kontrollen als auch in SPA4CT-Zellen deutlich das Wachstum steigern. Hingegen zeigte das konditionierte Medium keinen signifikanten Effekt auf SPA4CTΔcyto-exprimierende Zellen. Die Resultate (n = 6) wurden prozentual wiedergegeben als Mittelwert mit entsprechender SEM. Die Überprüfung signifikanter Gruppenunterschiede erfolgte mit einer one-way-ANOVA mit nachfolgender (C) Bonferroni-post-hoc-Analyse oder einem (D) unpaaren t-test (\*\*, p < 0,01; \*\*\*, p < 0,001).

### **3.1.3 Identifizierung der differentiellen APP-Expression im Kolon- und Pankreaskarzinom**

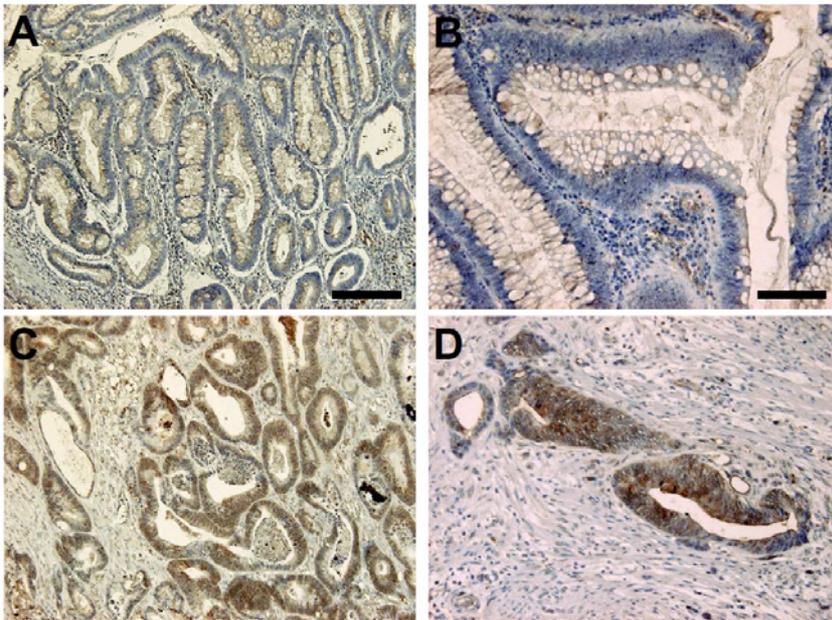
Das APP wird ubiquitär in nahezu allen Zellen und Geweben exprimiert. Im neuronalen Gewebe wird hauptsächlich die kürzeste Isoform APP695 exprimiert. Hingegen werden in glialen und anderen nicht-neuronalen Zellen überwiegend die APP751 und APP770-Isoformen vorgefunden (Wertkin et al., 1993).

Um die zelluläre Expression von APP in Karzinomen zu untersuchen wurden exemplarisch jeweils drei Pankreas- und Kolonkarzinom-Präparate untersucht. Umliegendes gesundes Gewebe diente jeweils als interne Negativkontrolle. Als Postivkontrolle wurden Hirnpräparate von APP/PS1KI transgenen Mäusen verwendet. Die immunhistochemischen Analysen wurden mit zwei APP-spezifischen Antikörpern (22C11 und 23850) durchgeführt. Zur histologischen Begutachtung der Gewebsmorphologie wurde von jedem Gewebeschnitt zusätzlich eine HE-Färbung angefertigt (Daten nicht gezeigt).

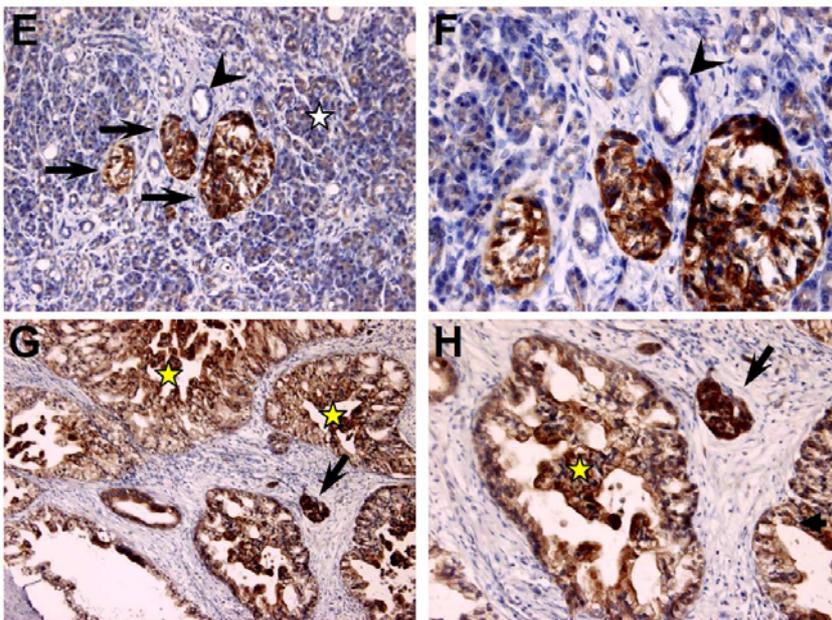
Die untersuchten Fälle zeigten mehrheitlich eine deutliche tumorspezifische Reaktion beider APP-Antikörper, wobei auf dem gesunden Gewebe, das die Tumoren umgab nur eine schwache bis keine Färbung zu detektieren war. Bei der Analyse der APP-Expression im Kolonkarzinom zeigte das maligne entartete Gewebe eine starke zytoplasmatische Färbung. Im umliegenden Stroma, als auch in den gesunden Kolonepithelzellen konnte keine Expression des APP festgestellt werden. Beim duktalem Adenokarzinom des Pankreas zeigte sich ein ähnliches Färbemuster. Im Gegensatz zu normalen duktalem Strukturen, präsentierten hier die flächenhaft formierten malignen Pankreastumorzellen ein intensives Färbemuster. Die serösen Azinuszellen zeigten vergleichsweise nur eine schwache APP-Färbung. Interessanterweise konnte in den endokrinen Langerhans Inseln eine prägnante Expression beobachtet werden.

Zur Testung der Spezifität beider Antikörper wurden in der gleichen Färbeserie auch Gehirne von APP-transgenen Mäusen immunhistochemisch gefärbt. Hier wurden 6 Monate alte APP/PS1KI Mäuse verwendet. Dieses Alzheimer-Mausmodell zeigt eine Überexpression von humanem mutierten APP (London und Schweden Mutation) und zwei Präsenilin-1 (PSEN-1) Mutationen (M22T/L235P) im mauseigenen PSEN-1, daher steht KI für „*knock in*“ (Casas et al., 2004). Beide Antikörper zeigten bei entsprechenden Verdünnungen eine spezifische, zytoplasmatische Neuronen-Färbung. Das APP-Expressionsmuster in gastrointerstinalen Tumoren ist in Abbildung 3.3 exemplarisch dargestellt.

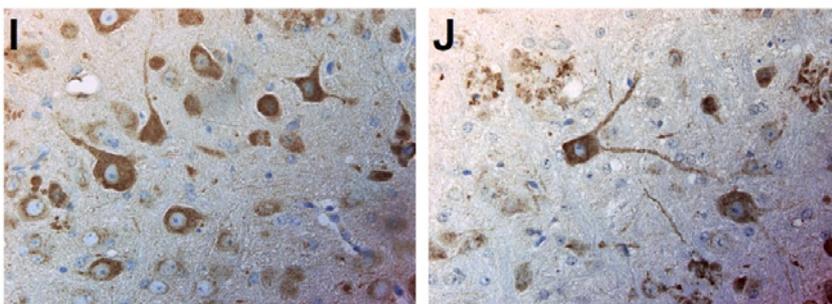
**Kolon**



**Pankreas**



**APP/PS1KI Gehirne**



**Abb. 3.3:**  
**Die immunhistochemische Analyse der APP-Expression in gastrointestinalen Tumoren.** Representative Gewebeschnitte von humanen Pankreas- und Kolonkarzinom-Präparaten wurden mit zwei N-terminal-spezifischen APP-Antikörpern gefärbt. (A-D) Kolongewebe wurde mit dem polyklonalen Antikörper 23850 (1:500) gefärbt. (A und B) Gesundes Kolonepithel zeigte nur eine schwache Färbung, während (C und D) neoplastisches Gewebe hohe Expressionsspiegel aufwies. (E-H) Pankreasgewebe wurde immunhistochemisch mit dem APP-Antikörper 22C11 (1:250) gefärbt. (E und F) In normalem Gewebe konnte nur eine schwache APP-Expression in den Azinuszellen nachgewiesen werden (weißer Stern). Die dukталen Ausführungsgänge waren komplett APP-negativ (Pfeilspitze). Hingegen präsentierten die eingestreuten Langerhans Inseln eine intensive APP-Färbung (Pfeile). (G und H) Im Kontrast zu gesundem Gewebe, wiesen alle neoplastischen Pankreas-Karzinomzellen eine sehr starke zytoplasmatische APP Expression auf (gelber Stern). (I und J) APP/PS1KI Mäusehirne dienten als Positivkontrolle und bestätigten die Spezifität beider Antikörper. (I) 22C11 (1:250) und (J) 23850 (1:500). Balken, A, C, E und G, 100 µm; B, D, F, H, I und J, 50 µm

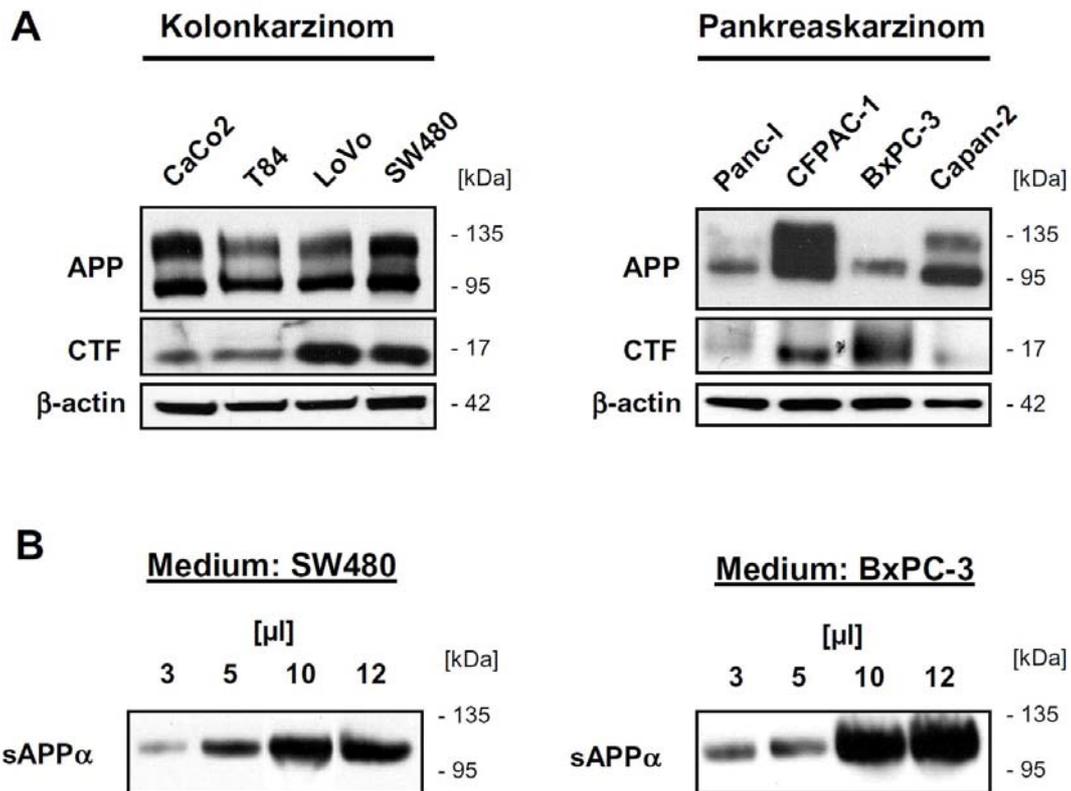
### 3.1.4 Expression und Prozessierung vom APP in etablierten Kolon- und Pankreaskarzinomzelllinien

Um die APP-Expression in etablierten Kolon- und Pankreaskarzinomzelllinien zu untersuchen wurden pro Tumorentität jeweils vier verschiedene Linien mittels Western-Blot-Analyse untersucht. Als Positivkontrolle wurden Zelllysate von APP-transfizierten Zellen oder Hirnlysate von transgenen APP/PS1KI-Mäusen verwendet. Da durch Western-Blot-Analysen nur eine Momentaufnahme der APP Menge wiedergegeben wird, kann mittels dieser Methodik keine genaue Aussage über den APP-Metabolismus und die Sekretase-Aktivität getroffen werden. Durch die weitere Analyse der akkumulierten zellgebundenen Carboxy-terminalen Fragmente (CTF) konnte indirekt auf eine hohe proteolytische Umsetzung (*turn-over*) und dementsprechend auf einen hohen APP Metabolismus geschlossen werden (Hansel et al., 2003).

Folgende Kolonkarzinom-Zelllinien wurden untersucht: CaCo2, T84, LoVo und SW480. Das APP war in allen Kolonkarzinom-Linien gleich stark exprimiert. Die weitere Analyse von APP-Prozessierungsprodukten zeigte besonders in der LoVo- und SW480-Zelllinie eine starke Akkumulation der CTF bei 17 kDa. In den Pankreaskarzinomzelllinien Panc-I, CFPAC-1, BxPC-3 und Capan-2 waren unterschiedlich hohe APP Expressionen zu detektieren. Besonderes in BxPC-3- und CFPAC-1-Zellen konnte eine deutliche CTF-Bande nachgewiesen werden. Da sowohl in SW480- als auch BxPC3-Zellen ein starker APP-Metabolismus vermutet wurde, folgte anschließend die Messung von sekretiertem sAPP $\alpha$  im Zellkulturüberstand. Um die Detektionsschwelle von sAPP $\alpha$  durch den W-02 Antikörper zu bestimmen wurden jeweils 3-12  $\mu$ l des konzentrierten Mediums durch Western Blotting analysiert. Konsistent zu den hohen CTF-Spiegeln war für beide Zelllinien ein deutlicher Nachweis von endogen prozessierten sAPP $\alpha$  kennzeichnend (Abb 3.4).

Die Pharmakomodulation des APP-Metabolismus wurde in den weiteren Versuchen exemplarisch in der Kolonkarzinomzelllinie SW480 und der Pankreaskarzinomzelllinie BxPC-3 durchgeführt.

Um die Relevanz des APP nicht nur auf das Pankreas- und Kolonkarzinom zu beschränken, wurden ebenfalls die APP-Expression in etablierten Keimzell-, Prostata-, Glioblastom und cholangiozellulären (Gallenblase)- Karzinomlinien untersucht (siehe Kapitel 3.2.1 und Kapitel 6.2).



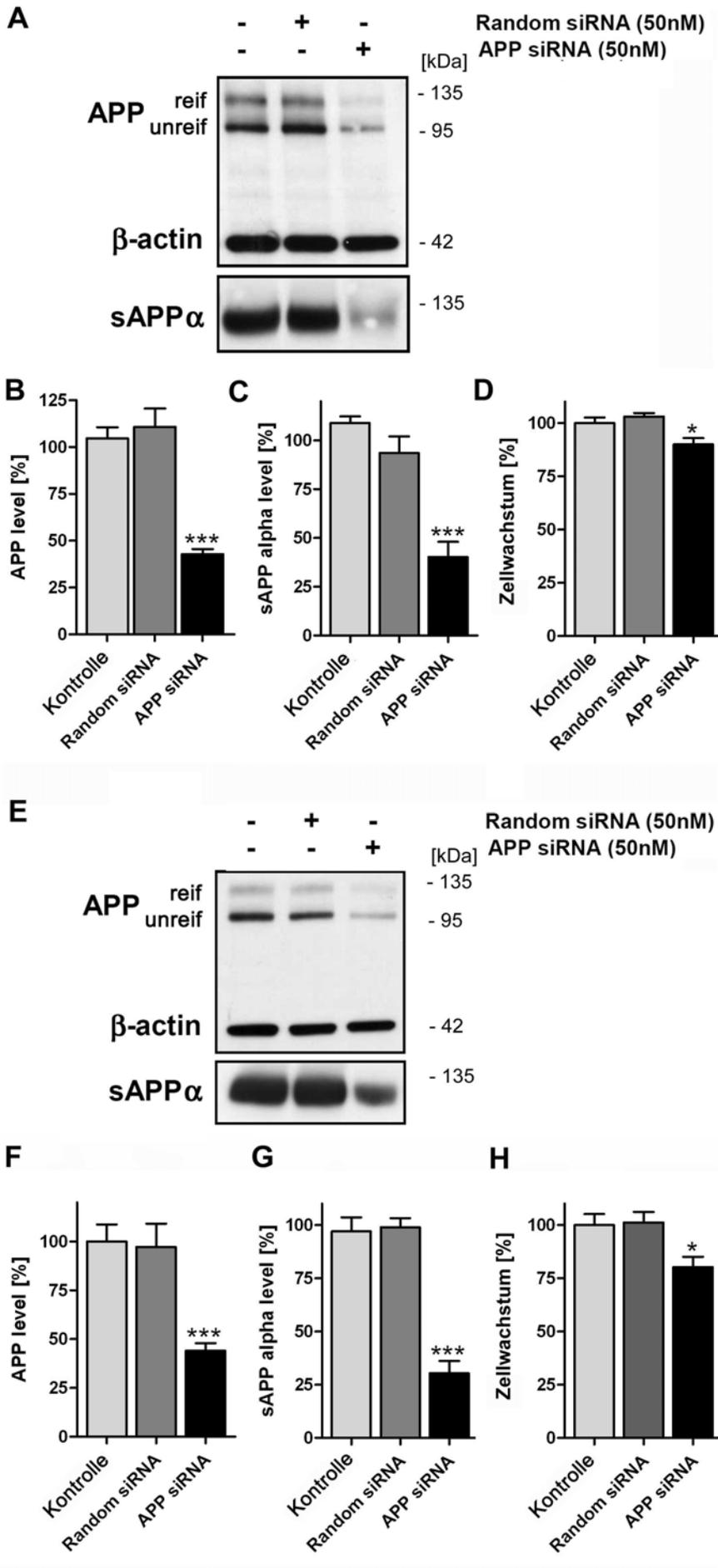
**Abb. 3.4:** Expression von APP und seinen Prozessierungsprodukten in etablierten Kolon- und Pankreaskarzinomzelllinien. (A) Aus den Karzinomzelllinien wurden Gesamt-Proteine isoliert und das Medium aufbereitet. Daraufhin erfolgten Western-Blot-Analysen mit dem W-02 Antikörper, womit im Zelllysate die APP-Doppelbande (110-130 kDa) und die CTF (17 kDa), als auch im (B) Medium sAPP $\alpha$  (110 kDa) detektiert werden konnten. Zur Kontrolle äquivalenter Proteinmengen wurde  $\beta$ -actin (42 kDa) verwendet.

### 3.1.5 Herunterregulierung der APP-Expression in Kolon- und Pankreaskarzinomzelllinien mittels RNA-Interferenz

Da eine Überexpression von APP deutlich das Wachstum von Zellen steigerte („*gain-of-function*“-Experiment), wurden im nächsten Experiment die Expression des APP durch gezielte Gen-Inaktivierung mittels RNA-Interferenz (RNAi) herunterreguliert („*loss-of-function*“-Experiment). Um eine Aussage über die Funktion und Relevanz von APP in Karzinomen zu treffen, wurden hierfür die Kolonkarzinomzelllinie SW480 und die Pankreaskarzinomzelllinie BxPC-3 verwendet. Um zu überprüfen ob APP einen signifikanten Einfluss auf die Proliferation von Karzinomen besitzt, wurde ein MTS-Assay nach Herunterregulierung der APP-Expression durchgeführt. Dazu wurden beide Zelllinien mit APP-spezifischen Duplex-siRNA-Oligonukleotiden (APP siRNA, *small interfering RNA*) transfiziert. Als adäquate Kontrollexperimente wurde eine nicht-inaktivierende siRNA

(*Random* siRNA) verwendet und dazu eine reine Medium-Kontrolle mitgeführt. Die Effektivität der Runterregulation von APP und des sekretierten  $\alpha$ -Sekretase Produktes sAPP $\alpha$  wurde 48 h nach der Transfektion durch Western Blot-Analysen untersucht (Abb. 3.5 A und E). Dargestellt sind die prozentualen APP-Levels. Hierfür wurde das Verhältnis der Bandintensitäten des APP- und des  $\beta$ -actin-Signals relativ zur unbehandelten Kontrolle wiedergegeben (Abbildung 3.5 B und F). Für die Quantifizierung der sAPP $\alpha$ -Menge ist das Verhältnis der Bandintensitäten von behandelten und unbehandelten Kontrollen prozentual wiedergegeben worden (Abbildung 3.5 C und G).

Durch den Einsatz von APP-siRNA konnte effektiv in beiden Zelllinien APP und sAPP $\alpha$  runterreguliert werden, während *Random*-siRNA keinen signifikanten Effekt im Vergleich zu unbehandelten Medium-Kontrollen zeigte. In BxPC-3 Zellen wurde das APP um  $62 \pm 2,7\%$  und das sAPP $\alpha$  um  $69 \pm 7,7\%$  runterreguliert. In SW480 konnte das APP um  $56 \pm 3,9\%$  und sAPP $\alpha$ -Spiegel um  $67 \pm 5,7\%$  reduziert werden. In denselben Lysaten wurden die Expression des homologen Familienmitglieds APLP2 untersucht, um die Selektivität der siRNA zu untermauern. In beiden Linien konnte keine Änderung vom APLP2 festgestellt werden (Kapitel 6.3). Weiterhin wurde auch das Wachstumsverhalten nach RNAi-Behandlung durch einen MTS-Assay untersucht. Hierfür wurden nach Transfektion jeweils  $25 \times 10^3$  Zellen in 96-well Platten überführt und nach 72 h die Proliferation gemessen. Im Vergleich zu *Random*-siRNA führte eine selektive Runterregulierung vom APP in beiden Karzinomzelllinien zu einer signifikanten Inhibition des Tumorwachstums (Abbildung 3.5 D und H).



**Abb. 3.5: Herunterregulation der APP-Expression durch RNA-Interferenz inhibierte das Tumorwachstum.** Die gezielte Gen-Inaktivierung mittels RNAi führte zur Runterregulation von APP und sAPPα in BxPC-3- (A-C) und SW480- (E-G) Karzinomzelllinien. Beide Linien wurden mit APP-spezifischer (50 nM APP siRNA), als auch mit nicht-sequenz homologen Negativkontrollen (50 nM Random siRNA) transfiziert. Als weitere Kontrolle dienten Medium-behandelte Zellen. Der spezifische „knock down“ vom APP führte in beiden Karzinomzelllinien zu einer signifikanten Inhibition des Tumorwachstums (D und H). Die Ergebnisse (n = 6) sind prozentual als Mittelwert mit entsprechender SEM wiedergegeben. Die Überprüfung signifikanter Unterschiede zwischen den Gruppen erfolgte durch eine one-way-ANOVA mit nachfolgender Bonferroni-post-hoc-Analyse (\*, p < 0,05; \*\*\*, p < 0,001).

### **3.1.6 Inhibition des Tumorwachstums und Reduktion des APP und seiner sekretierten Prozessierungsprodukte durch Valproat**

Zahlreiche Studien zeigten die anti-karzinogene Wirkung von Valproat (VPA) *in vitro* und *in vivo*. Um in Kolon- und Pankreskarzinomen die Effekte von VPA zu charakterisieren, wurden exemplarisch für das Pankreaskarzinom die BxPC-3- und für das Kolonkarzinom die SW480-Zelllinien verwendet. Hierfür sind die Zellen für 24 h mit aufsteigenden VPA Konzentrationen (von 0 bis 100 mM) inkubiert worden. Anschließend erfolgte die Analyse durch einen MTS-Assay. Die gemessenen Extinktionen wurden prozentual im Verhältnis zu unbehandelten Kontrollen (0 mM) wiedergegeben. Wie bereits erwartet, resultierte in beiden Zelllinien die Behandlung mit VPA in einer konzentrationsabhängigen Inhibition des Zellwachstums (Abbildung 3.6 A und D).

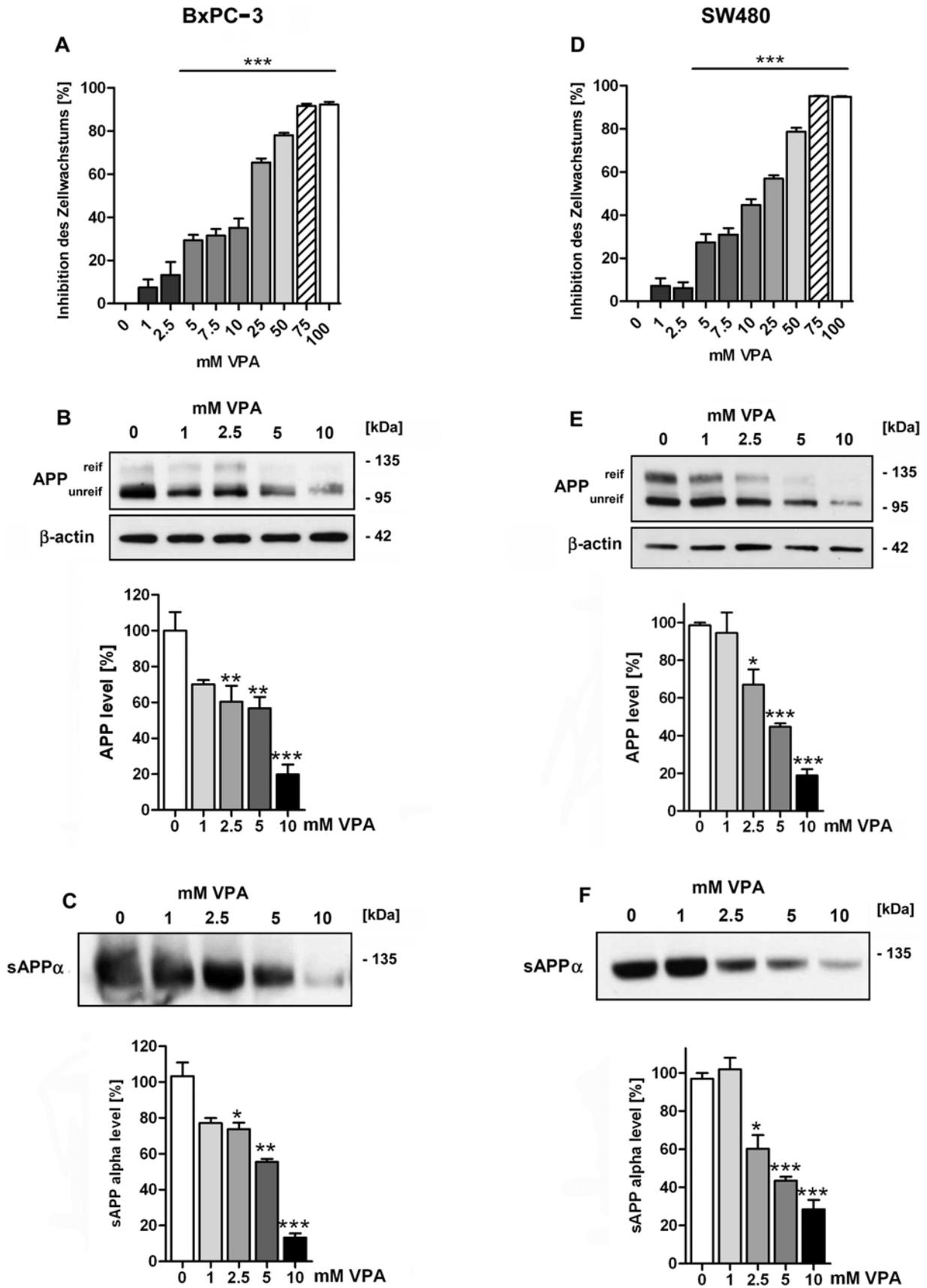
Durch den MTS-Assay konnte nur eine Aussage über die Zellviabilität getroffen werden. Um zwischen einen zytostatischen Effekt und der Induktion einer Nekrose zu unterscheiden, wurde ebenfalls ein Zytotoxizitätsassay (LDH-Assay, CytoTox96<sup>®</sup>-Non-Radioactive-Cytotoxicity-Assay, Promega) durchgeführt. Hier zeigte sich, dass Konzentrationen bis zu 25 mM keine signifikante LDH-Freisetzung in SW480-Zellen auslöste. Dadurch konnte eine VPA-induzierte Zytotoxizität ausgeschlossen werden (Kapitel 6.4).

Um weiter die Effekte auf APP und seine Prozessierungsprodukte zu untersuchen, wurden beide Zelllinien für 24 h mit 0-10 mM VPA behandelt. Anschließend wurde das Medium abgenommen und aufbereitet. Die Zellen wurden lysiert und Proteine isoliert. Durch Verwendung des W-02 Antikörpers konnten spezifisch APP in Zelllysat und sAPP $\alpha$  im Kulturmedium detektiert werden. Wie auch in Kapitel 3.1.6 wurden sowohl APP- als auch sAPP $\alpha$ -Spiegel prozentual zu unbehandelten Kontrollen (0 mM) wiedergegeben (Abbildung 3.6 B-F).

VPA führte in beiden Zelllinien zu einer effektiven Reduktion vom APP. Eine signifikante Suppression von APP wurde in BxPC-3 ab 1 mM VPA ( $30 \pm 2,3\%$ ) nachgewiesen. Wie folgt führten 2.5 mM zu einer  $40 \pm 8,9\%$ , 5 mM zu einer  $43 \pm 6,2\%$  und 10 mM zu einer  $80 \pm 5,4\%$  Reduktion der APP-Level.

In SW480-Zellen wurde das Signifikanzniveau ab 2.5 mM VPA erreicht. Hier führte 1 mM zu einer  $6 \pm 10\%$ , 2.5 mM zu einer  $43 \pm 8,1\%$ , 5 mM zu einer  $55 \pm 1,7\%$  und 10 mM zu einer  $82 \pm 3,3\%$  Reduktion der APP-Spiegel. Konsistent hierzu konnten die Spiegel von sAPP $\alpha$  im gleichen Verhältnis wie das APP herunterreguliert werden. Analysen mit dem 22C11 Antikörper wurden durchgeführt, um Gesamt-sAPP (sAPP $\alpha$  und sAPP $\beta$ ) nachzuweisen.

Hier konnte beobachtet werden, dass alle N-terminalen APP-Sekretionsprodukte (sAPP $\alpha$  und sAPP $\beta$ ) durch eine VPA Behandlung gesenkt wurden. Damit konnte indirekt ausgeschlossen werden, dass zusätzlich zur APP-Reduktion auch die Enzymaktivität(en) der  $\alpha$ -Sekretase(n) beeinflusst wurden (Kapitel 6.5).



**Abb. 3.6: Inhibition des Tumorwachstums und Reduktion des APP und seiner sekretierten Prozessierungsprodukte durch VPA.** (A und D) Die Behandlung von SW480- und BxPC-3-Zellen mit VPA führte nach 24 h zu einer dosisabhängigen Abnahme der Proliferation. (B-F) Nachdem beide Zelllinien für 24 h mit aufsteigenden VPA-Dosen behandelt worden sind, wurden Zellysate erstellt und das Medium aufbereitet. Danach erfolgten Western-Blot-Analysen mit dem W-02 Antikörper. Eine VPA-Behandlung führte in beiden Zelllinien zu einer konzentrationsabhängigen Reduktion von (B und E) APP und (C und F) sAPP $\alpha$ . Alle Experimente wurden mindestens dreimal durchgeführt. Für statistische Vergleiche wurde eine one-way-ANOVA mit nachfolgender Bonferroni-post-hoc-Korrektur durchgeführt. Das jeweilige Signifikanzniveau ist in den Diagrammen mit \* für  $p < 0,05$ ; \*\* für  $p < 0,01$  und \*\*\* für  $p < 0,001$  gekennzeichnet.

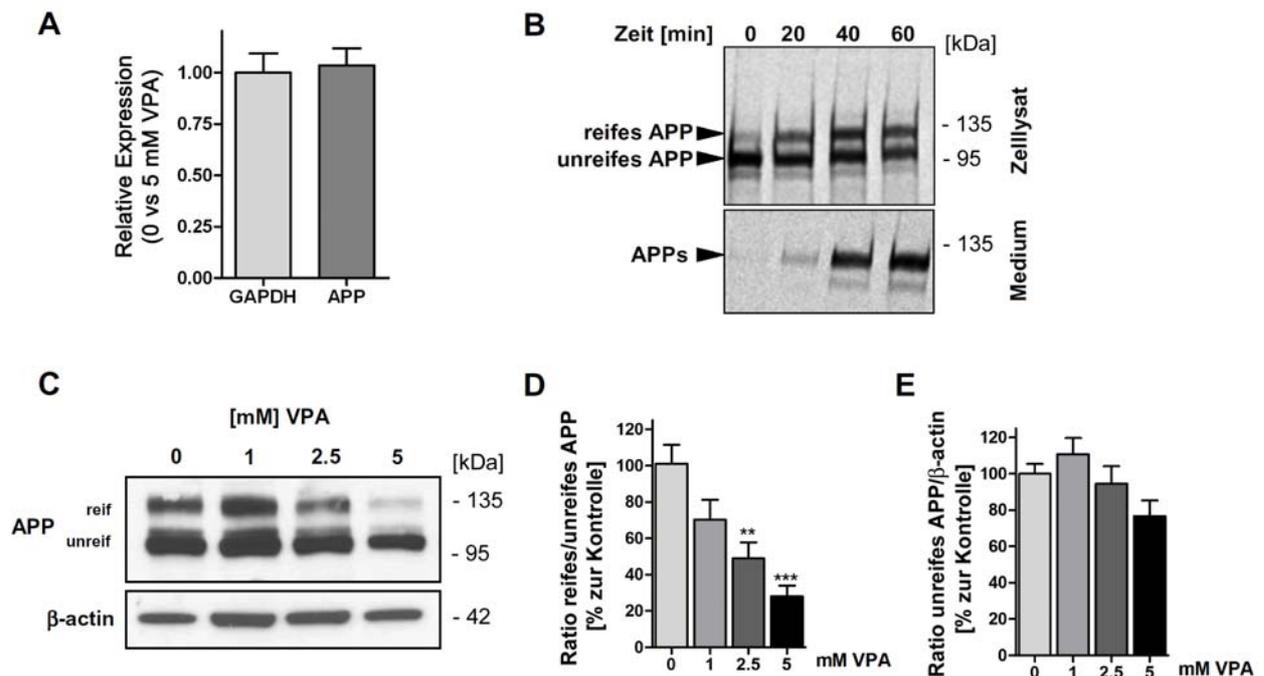
### 3.1.7 Inhibition der korrekten Reifung des APP durch Valproat

Um weiter den Mechanismus der VPA-induzierten APP Reduktion zu eruieren, wurde als erstes die Genexpression des APP-Antigens nach einer VPA Stimulation untersucht. Hierfür wurden SW480-Zellen entweder mit 5 mM VPA oder Medium (Kontrolle) behandelt. Anschließend wurde die RNA isoliert, in cDNA translatiert und anschließend mit APP- und GAPDH (*glyceraldehyd 3 phosphat dehydrogenase*)-spezifischen Primern eine RT-PCR Analyse durchgeführt. Das konstitutiv exprimierte *Housekeeping Gen* GAPDH wurde als interner Standard eingesetzt. Dargestellt wurde die relative Expression von APP und GAPDH nach der Behandlung mit 5 mM VPA zu unbehandelten Kontrollen (Abbildung 3.7 A). Eine Exposition von VPA führte zu keiner signifikanten Änderung der Genexpression von APP.

Dies veranlasste im Weiteren die genauere Untersuchung der Reifung (Maturation) von APP. Wie die meisten sekretorischen Proteine auch, gelangt das APP über den konstitutiv sekretorischen Weg und einer post-translationalen Reifung an die Plasmamembran. Die post-translationalen Modifikationen des Proteins finden im endoplasmatischen Retikulum und anschließend im Golgi-Apparat statt. Hierbei kann zwischen zwei verschiedenen Reifegrade unterschieden werden: die unreife (immature) APP-Form (N-glykosyliert) und eine reife (mature) APP-Form (N- und O-glykosyliert, tyrosyl-sulfatiert) (Weidemann et al., 1989). Um die physiologische Maturation des APP in SW480-Zellen zu studieren, wurden *Pulse-Chase*-Analysen durchgeführt. Hierdurch konnte die untere Bande (bei 110 kDa) als unreife und die obere Bande (bei 130 kDa) als reife APP-Form identifiziert werden. Weiterhin konnte eine zeitabhängige Maturation und Sekretion von APP nachgewiesen werden. Ab dem Zeitpunkt (20 min) wo die unreife Form in die reife Form überging, konnte gleichzeitig im Medium das sekretierte sAPP detektiert werden (Abbildung 3.7 B). Für diese Analysen wurde der polyklonale APP Antikörper 5313 verwendet (Tamboli et al., 2005).

Um den Effekt von VPA auf die APP-Maturation zu charakterisieren, wurden SW480-Zellen mit aufsteigenden Konzentrationen VPA (0 bis 5 mM) behandelt und die Ratio der

Bandintensitäten von der unreifen und der reifen APP Form quantifiziert. Die Behandlung mit VPA führte zu einer kontinuierlichen Abnahme des Verhältnisses von reifem zu unreifen APP, während die Spiegel von unreifen APP unverändert blieben (Abbildung 3.7 D und E). Zusammenfassend konnte hier festgestellt werden dass die VPA Behandlung keinen Effekt auf die transkriptionelle Regulation der APP-Genexpression hatte. Vielmehr wurde auf post-translationaler Ebene die Reifungseffizienz des APP vermindert, mit der Folge einer erniedrigten Sekretion von sAPP $\alpha$ .



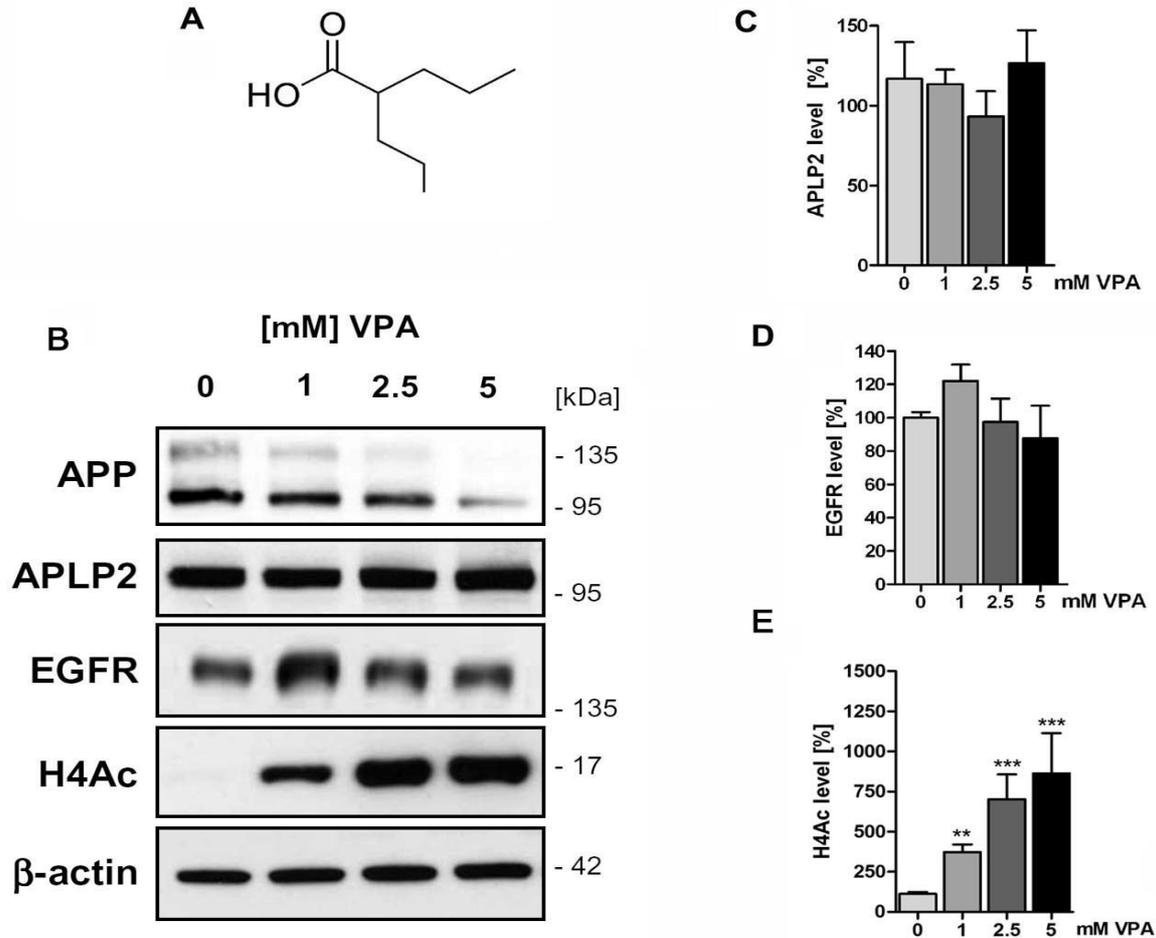
**Abb. 3.7: Inhibition der korrekten Reifung des APP durch Valproat.** (A) Die Behandlung mit VPA führte zu keiner Alteration der Genexpression von APP und GAPDH. (B) Durch Pulse-Chase-Analysen konnte festgestellt werden, dass zeitgleich mit dem Auftreten der reifen APP-Form, im Medium das sekretierte APP (sAPP) detektiert werden konnte. Dadurch konnte in SW480-Zellen die untere (110 kDa) als unreife und die obere (130 kDa) als reife Bande definiert werden. (C) SW480-Zellen wurden mit aufsteigenden Konzentrationen von VPA (0 – 5 mM) behandelt. Danach erfolgte die Western-Blot-Analyse mit dem W-02 Antikörper. Die reife und unreife APP-Form wurden densitometrisch quantifiziert und entweder als Ratio reifes/unreifes APP oder unreifes APP/ $\beta$ -actin wiedergegeben. Die Ergebnisse resultieren aus drei unabhängigen Experimenten. Die Resultate wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM wiedergegeben. Statistische Unterschiede unter den Gruppen wurden durch eine one-way-ANOVA mit anschließender Bonferroni-post-hoc-Analyse errechnet. (\*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ).

### 3.1.8 Spezifische Reduktion der APP-Proteinexpression durch Valproat

Da VPA durch seine HDAC-inhibitorischen Eigenschaften zahlreiche Effektorproteine modulieren kann, stellte sich die Frage, ob die Effekte auf den APP-Metabolismus spezifisch

sind. Hierzu wurden die Proteinexpressionen von dem Typ-I-Transmembranprotein EGFR und das homologe APP-Familienmitglied APLP2 auf untersucht.

Um den Einfluss von VPA auf die Proteinexpression von EGFR und APLP2 zu untersuchen, wurden SW480-Zellen mit aufsteigenden VPA-Konzentrationen für 24 h behandelt und mit Gesamt-Proteinen Western-Blot-Analysen durchgeführt. Zur Detektion des jeweiligen Antigens wurde neben dem APP-Antikörper W-02, EGFR (1005) und APLP2 (D2-II) als Primärantikörper eingesetzt. Ein spezifischer Antikörper gegen H4Ac diente als Surrogatmarker zur Überprüfung einer effektiven HDAC-Inhibition. Weder EGFR noch das APLP2 zeigte eine konzentrationsabhängige Regulation. Sogar unter 5 mM VPA, wo bereits mehr als 50% der APP Proteins reduziert waren (siehe Kapitel 3.1.6) konnte keine signifikante Alteration der Proteinspiegel von EGFR und APLP2 nachgewiesen werden (Abbildung 3.8).



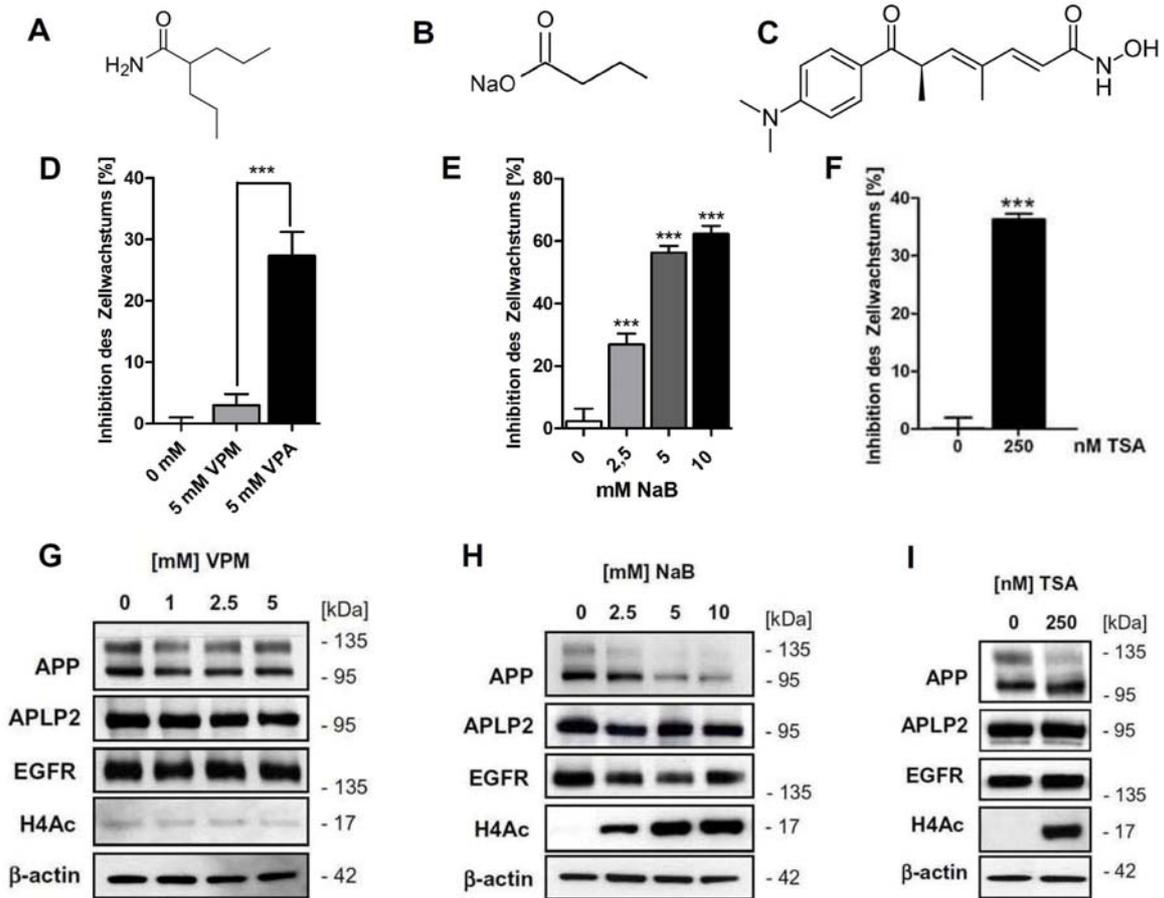
**Abb. 3.8: Spezifische Reduktion der APP-Proteinexpression durch Valproat.** (A) Strukturformel der kurzkettigen Fettsäure VPA (2-Propylpentansäure) (B) Nach einer 24-stündigen Behandlung von SW480-Zellen mit aufsteigenden VPA Konzentrationen wurde Gesamt-Protein isoliert und Western-Blot-Analysen mit APP-, APLP2-, EGFR- und H4Ac-spezifischen Antikörpern durchgeführt. Die entsprechenden Bandintensitäten wurden densitometrisch quantifiziert. Konsistent zum supprimierten APP konnte nach VPA Behandlung eine konzentrationsabhängige Hyperacetylierung von Histon H4 (H4Ac) nachgewiesen werden. Weder EGFR noch das APLP2 wurden durch eine VPA Behandlung signifikant runterreguliert. Dargestellt sind die Quantifizierungen von (C) APLP2, (D) EGFR und von (E) H4Ac. Jedes Experiment wurde dreifach ausgeführt und die Resultate als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. Die Signifikanzberechnung erfolgte durch eine one-way-ANOVA mit nachfolgender Bonferroni-post-hoc-Analyse (\*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ).

### 3.1.9 Die Inhibition von Histondeacetylasen führt zu einer spezifischen Modulation des APP-Metabolismus

Um den Beweis zu erbringen, dass die VPA-induzierten Effekte auf den APP-Metabolismus durch eine HDAC-Hemmung vermittelt worden sind, wurde das VPA-Analogon Valpromid (VPM), die ebenfalls kurzkettige Fettsäure Natriumbutyrat (NaB) und die Hydroxamsäure Trichostatin A (TSA) verwendet. Das Valpromid (2-n-Propyl-Pentansäureamid) ist ein primäres Amid des VPA. Die Substitution der Carboxy- durch eine Amidgruppe führt zum

Verlust der HDAC-inhibitorischen Wirkung. Daher wurde VPM als Negativkontrolle verwendet. Als Positivkontrolle wurden der klassenverwandte HDAC-Inhibitor NaB (Boffa et al., 1978) und der nicht-strukturverwandte Pan-HDAC-Inhibitor TSA (Yoshida et al., 1990) verwendet.

Zuerst wurden Proliferationsanalysen (MTS-Assay) in der SW480-Zelllinie durchgeführt. Im Gegensatz zu VPA präsentierten äquimolare Dosen von VPM keine deutliche Wachstumsinhibition. Hingegen führten sowohl aufsteigende Konzentrationen von NaB (0 mM bis 10 mM) als auch 250 nM des Pan-HDAC-Inhibitors TSA zu einer signifikanten Reduktion der Zellzahl (Abbildung 3.9 D-F). Anschließend erfolgten Western-Blot-Analysen, um auf Proteinebene die Expressionen von APP, APLP2, EGFR und H4Ac zu untersuchen. Konsistent mit der Ausgangshypothese konnte durch eine VPM Behandlung keine konzentrationsabhängige Zunahme der Hyperacetylierung von Histon H4 (H4Ac) nachgewiesen werden. Erstaunlicherweise führte der Verlust der HDAC-inhibitorischen Eigenschaften auch zu keiner APP-Reduktion. Ebenfalls konnten keine Effekte auf APLP2 oder EGFR beobachtet werden (Abbildung 3.9 G). In Übereinstimmung mit der HDAC-induzierten Proliferationsinhibition und der Hyperacetylierung von Histonen (H4Ac) konnten sowohl NaB als auch TSA spezifisch APP reduzieren (Abbildung 3.9 H und I). Dadurch konnte nachgewiesen werden, dass APP HDAC-abhängig moduliert werden kann.

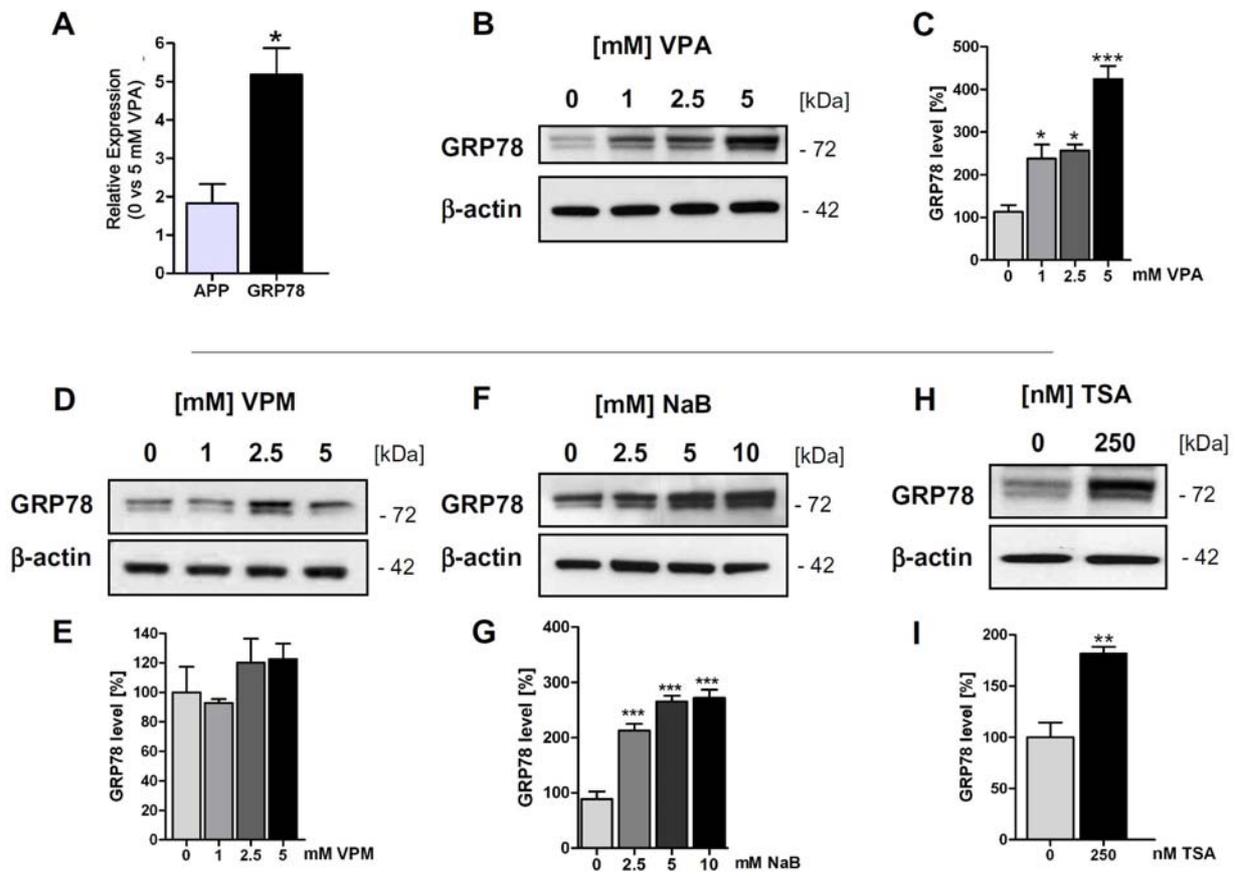


**Abb. 3.9: Die Inhibition von Histondeacetylasen führt zu einer spezifischen Modulation des APP-Metabolismus.** Chemische Strukturformeln von (A) VPM, (B) NaB und (C) TSA. SW480-Zellen wurden für 24 h mit aufsteigenden Dosen VPM, NaB oder TSA behandelt. (D) Im Gegensatz zu 5 mM VPA, präsentierten äquimolare VPM-Dosen nahezu keine wachstumsinhibierenden Eigenschaften. (E und F) Im Gegensatz hierzu zeigten NaB (im mM Bereich) und TSA (im nM Bereich) eine signifikante und konzentrationsabhängige Inhibition des Zellwachstums. (G) Eine Behandlung mit VPM zeigten keine Effekte, während (H) NaB als auch (I) TSA zu einer selektiven Suppression der APP-Expression führten. Sowohl EGFR als auch APLP2 waren durch eine HDAC-Inhibition nicht affiziert. Die Proliferationsanalysen wurden mindestens sechsfach ausgeführt. Die Ergebnisse wurden gemittelt und prozentual zur unbehandelten Kontrolle als Mittelwert  $\pm$  SEM wiedergegeben. Eine one-way-ANOVA mit nachfolgender (D, E) Bonferroni-post-hoc-Analyse oder ein (I) unpaarer t-Test ermittelte entsprechende Signifikanzen (\*\*\*,  $p < 0,001$ ).

### 3.1.10 Einfluss der Histondeacetylase-Inhibition auf die GRP78/BiP-Expression

Es stellte sich nun die Frage, wie HDAC-Inhibitoren über einen post-translationalen Regulationsweg spezifisch in den APP-Metabolismus eingreifen. Vorrangig Studien postulierten dass GRP78, ein ER-ständiges Chaperon, in der Lage ist spezifisch in den APP-Metabolismus einzugreifen (Yang et al., 1998; Bai et al., 2008). Daher wurde im nächsten Experiment überprüft ob durch eine HDAC-Inhibition die Expression vom GRP78 moduliert wird. Es wurden SW480-Zellen mit 5 mM VPA für 24 h behandelt, Gesamt-RNA isoliert und

die mRNA-Expression von APP, GRP78 und  $\beta$ -actin mittels RT-PCR untersucht. Die Resultate von APP und GRP78 wurden zur  $\beta$ -actin mRNA normalisiert und als relative Expression im Vergleich zu unbehandelten Kontrollen wiedergegeben. Unter VPA Behandlung konnte signifikant die Genexpression von GRP78 induziert werden ( $p = 0,019$ ). In Übereinstimmung mit vorherigen Analysen konnte keine Alteration der APP Genexpression festgestellt werden ( $p = 0.1$ ) (Abbildung 3.10 A). Um die Ergebnisse der RT-PCR auf Proteinebene zu bestätigen, wurden Western-Blot-Analysen mit einem GRP78-spezifischen Antikörper (C50B12) durchgeführt. Hier konnte eine konzentrationsabhängige Zunahme der GRP78-Expression nachgewiesen werden. Durch die Verwendung von VPM (Negativkontrolle) und zwei weiteren HDAC-Inhibitoren NaB und TSA (Positivkontrolle) konnte weiterhin gezeigt werden, dass eine klare HDAC-Abhängigkeit besteht. Die Behandlung mit NaB (im mM Bereich) und TSA (im nM Bereich) führte zu einer signifikanten und dosisabhängigen Hochregulierung von GRP78 Protein-Spiegeln. Eine äquivalente Behandlung mit VPM hingegen zeigte keinen signifikanten Effekt (Abbildung 3.10).

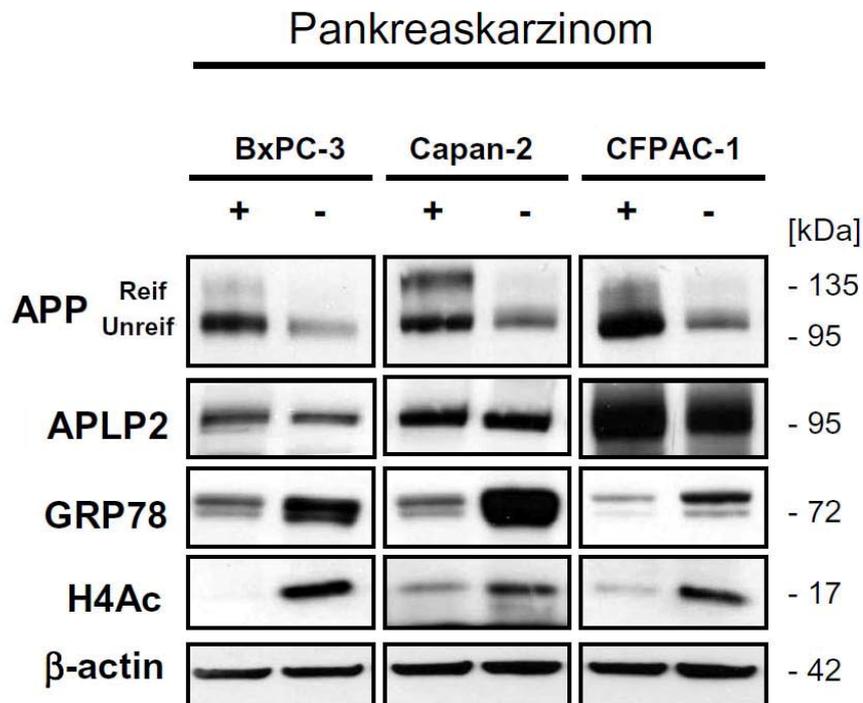
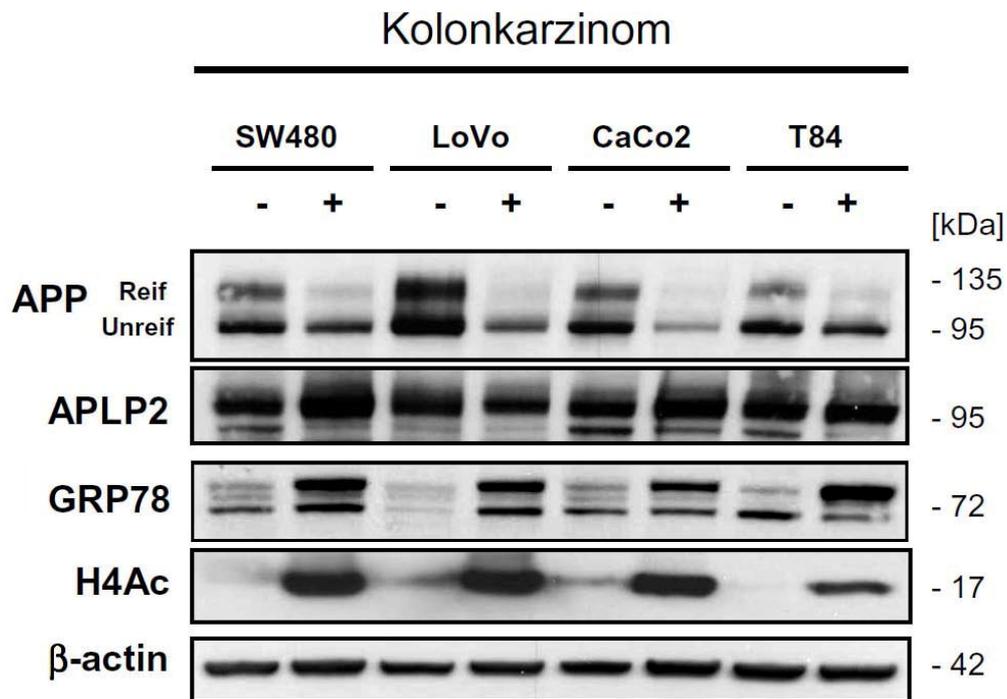


**Abb. 3.10: Einfluss der Histondeacetylase-Inhibition auf die GRP78/BiP-Expression.** (A) Nach einer Behandlung von SW480-Zellen mit 5 mM VPA wurde die RNA isoliert und durch eine RT-PCR-Analyse die Genexpression von APP und GRP78 untersucht. Die Expressionen wurden zum House-Keeping-Gen  $\beta$ -actin normalisiert. Es konnte eine signifikante Hochregulierung der GRP78 mRNA festgestellt werden. (B) Konsistent konnte auch auf Western-Blot-Ebene eine konzentrationsabhängige Induktion von GRP78 nachgewiesen werden. (D) Äquivalente Dosen von VPM bewirkten keine Änderung der Protein-Spiegel von GRP78. Ähnlich wie VPA, konnten sowohl (F) NaB als auch (H) TSA eine Expression von GRP78 induzieren. (C, E, G und I) Die densitometrischen Quantifizierungen von GRP78 wurden im Verhältnis zu  $\beta$ -actin gesetzt und prozentual zur unbehandelten Kontrolle wiedergegeben. Gezeigt sind die Mittelwerte  $\pm$  SEM aus mindestens vier separaten Experimenten. Statistische Signifikanzen wurde entweder durch eine one-way-ANOVA mit nachfolgender Bonferroni-Korrektur oder einem (I) unpaaren t-Test errechnet (\*,  $p < 0,05$ ; \*\*,  $p < 0,05$ , \*\*\*,  $p < 0,001$ ).

### 3.1.11 Validation der Histondeacetylase-abhängigen APP-Modulation in weiteren Pankreas- und Kolonkarzinomzelllinien

Um den Nachweis zu erbringen, dass es sich bei der HDAC-abhängigen Modulierbarkeit des APP-Metabolismus um ein allgemeingültiges Prinzip handelt, wurden additional pharmakologische Analysen in drei weiteren Kolonkarzinom- und zwei Pankreaskarzinomzelllinien durchgeführt. Folgende Kolonkarzinomzelllinien wurden dafür verwendet: LoVo-, CaCo2-, und die T84-Zelllinie. Repräsentativ für das Pankreaskarzinom

wurden die Capan-2- und die CFPAC-1-Zelllinien verwendet. Zum Vergleich der APP-Suppression wurden ebenfalls Stimulationen in der SW480- und BxPC-3-Zelllinie durchgeführt. Alle Zelllinien wurden für 24 h mit 5 mM VPA inkubiert. Danach wurden die Proteinlysate durch Western-Blot-Analysen auf APP, APLP2, GRP78, H4Ac und  $\beta$ -actin untersucht. In allen Zelllinien konnte spezifisch mit dem Grad der Hochregulation von H4Ac und der dadurch bedingten Induktion von GRP78 selektiv APP-Proteinspiegel reduziert werden. Dies verdeutlichte, dass die Modulierbarkeit des APP-Metabolismus in Karzinomen unabhängig von diversen genetischen Unterschieden der Zelllinien beeinflusst werden kann (Abbildung 3.11).



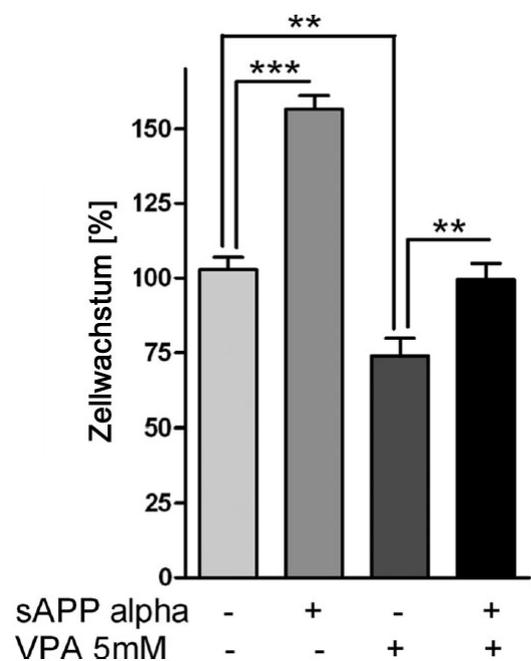
**Abb. 3.11: Validation der HDAC-abhängigen APP-Modulation in weiteren Pankreas- und Kolonkarzinomzelllinien.** Neben der SW480- und BxPC-3-Zelllinie wurden jeweils drei weitere Kolon- und zwei weitere Pankreaskarzinomzelllinien mit 5 mM VPA (+) oder mit Medium (-) für 24 h behandelt. Es erfolgten Western-Blot-Analysen mit Primärantikörpern gegen APP, APLP2, GRP78 und H4Ac. Die Auftragung von gleichen Proteinmengen wurde mit einem β-actin Antikörper bestätigt. In allen Zelllinien war durch eine VPA Behandlung die Hyperacetylierung von Histon 4 (H4Ac) mit einer Hochregulation von GRP78 begleitet. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass APP spezifisch runterreguliert wurde, ohne Nachweis einer gleichzeitigen Affektion der APLP2-Spiegel.

### 3.1.12 Antagonisierung des HDAC-induzierten Wachstumsarrests durch sekretiertes APP

Wie bereits gezeigt, konnte sekretiertes sAPP $\alpha$  als potenter Wachstumsfaktor die Proliferation in neuronalen Vorläuferzellen erhöhen (Kapitel 3.1.2). Abschließend ergaben sich nun zwei weitere Fragestellungen: Ist sAPP $\alpha$  in der Lage in Karzinomzellen das Wachstum zu fördern? Und kann exogen zugefügtes sAPP $\alpha$  die HDAC-vermittelte Wachstumsinhibition antagonisieren?

Um diese Fragen zu beantworten, wurde, wie in Kapitel 3.1.2 beschrieben, dass konditionierte Medium von SH-SY5Y APP695<sub>wt</sub> als sAPP $\alpha$ -Quelle verwendet. Für 24 h wurden SW480-Zellen entweder mit sAPP $\alpha$ , mit 5 mM VPA oder mit beiden (VPA und sAPP $\alpha$ ) behandelt. Als Kontrolle wurden Zellen mit serumfreiem Medium inkubiert. Exogene Addition von sAPP $\alpha$  konnte die Proliferation um 55 % in SW480-Zellen steigern. In Übereinstimmung mit zuvor erhobenen Daten konnte durch VPA die Proliferation um 29% gesenkt werden. Interessanterweise konnte weiterhin gezeigt werden, dass eine gleichzeitige Behandlung mit sAPP $\alpha$ , den wachstumsinhibierenden Effekt von VPA vollständig antagonisieren konnte (Abbildung 3.12).

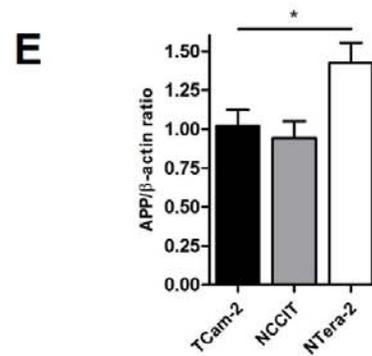
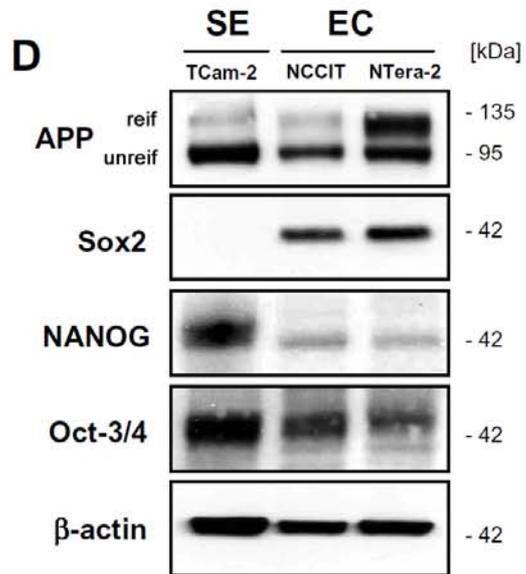
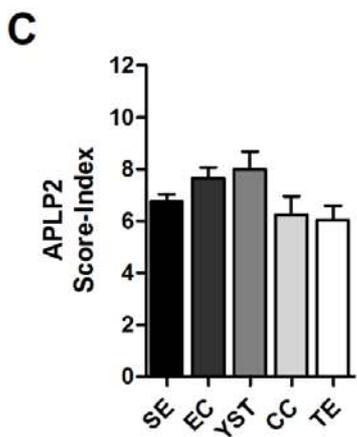
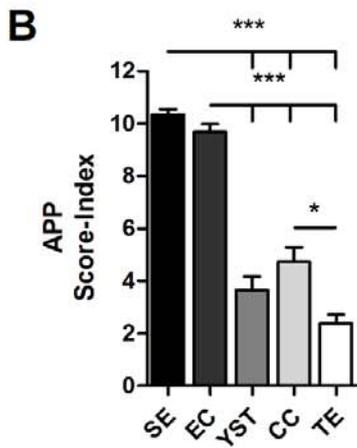
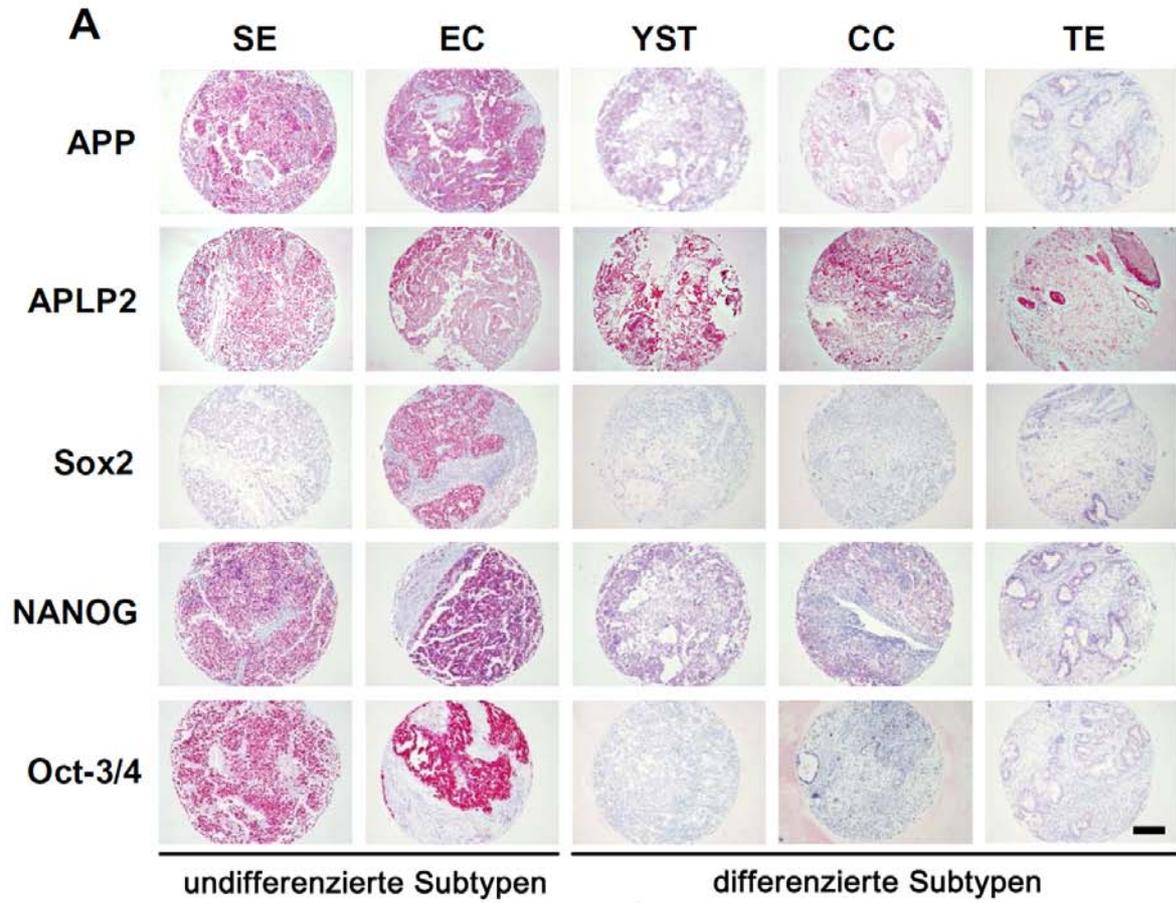
**Abb. 3.12: Sekretiertes APP antagonisiert Valproat-induzierten Wachstumsarrest.** Die Behandlung von SW480-Zellen mit sAPP $\alpha$  führte zu einer signifikanten Steigerung des Zellwachstums verglichen mit unbehandelten Kontrollen (serumfreies Medium). Der wachstumsinhibitorische Effekt von VPA konnte durch eine parallele Addition von exogenem sAPP $\alpha$  vollständig kompensiert werden. Die Proliferationsexperimente wurden mindestens sechsmal durchgeführt. Die Mittelwerte mit entsprechender SEM wurden prozentual im Verhältnis zur unbehandelten Kontrolle dargestellt. Signifikante Unterschiede wurden durch eine one-way-ANOVA mit anschließender Bonferroni-post-hoc-Analyse errechnet (\*\*,  $p < 0,01$ ; \*\*\*,  $p < 0,001$ ).



### **3.2 Projekt II: Das Amyloid-Vorläufer-Protein (APP) als Biomarker für transformierte, pluripotente Keimzelltumore**

#### **3.2.1 Korrelation der APP-Expression mit der Stammzellsignatur in pluripotenten Keimzelltumoren**

In diesem Abschnitt sollte untersucht werden, ob in testikulären Keimzelltumoren APP und das homologe Familienmitglied APLP2 differentiell exprimiert werden. Zur Validierung des Stammzellcharakters von testikulären Keimzelltumoren wurde zusätzlich die Expression von Sox2, Oct-3/4 und NANOG untersucht. In dieser Untersuchung wurden insgesamt 173 Keimzelltumor-Präparate von verschiedenen Tumorsubtypen immunhistochemisch untersucht. Diese enthielten sowohl einheitliche histologische Typen (reine testikuläre Keimzelltumoren) als auch Mischtumoren, die aus einer Kombination verschiedener histologischer Subtypen zusammengesetzt waren. Anschließend wurden sowohl APP- als auch APLP2-Expressionen semi-quantitativ als immunreaktiver Score-Index wiedergegeben. Hier zeigte sich deutlich, dass APP nur in den undifferenzierten, pluripotenten Seminomen und embryonalen Karzinomen stark exprimiert war. Konsistent mit dem Verlust der Stammzellsignatur in differenzierten histologischen Subtypen konnten nur eine schwache oder keine APP-Expression nachgewiesen werden (Abbildung 3.14 A und B). Interessanterweise zeigte die Expression von APLP2 ein anderes Muster. Sowohl in undifferenzierten als auch hoch-differenzierten Subtypen, konnte konstant APLP2 nachgewiesen werden. Insbesondere in differenzierten epithelialen Strukturen des Teratoms war APLP2 stark repräsentiert, während das umliegende Stromagewebe nur eine schwache Färbung aufwies (Abbildung 3.14 A und D). Um weiter die Expressionen von APP und Stammzellgenen *in vitro* zu untersuchen, wurden exemplarisch für das embryonale Karzinom die NTERA-2 und die NCCIT-Zelllinie und für das Seminom die Tcam-2-Zelllinie charakterisiert. Gemäß der Biologie von Seminomen, konnte in der Tcam-2 keine Expression von Sox2 detektiert werden. Hingegen waren besonders NANOG und Oct-3/4 stark exprimiert. In allen Zelllinien konnte eine prägnante Expression von APP nachgewiesen werden. Im Vergleich zu Tcam-2 und NCCIT präsentierte die NTERA-2-Zelllinie signifikant höhere APP-Spiegel (Abbildung 3.14 D und E). Ebenfalls konnte in dieser Linie ein deutlich höherer CTF-Spiegel nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).



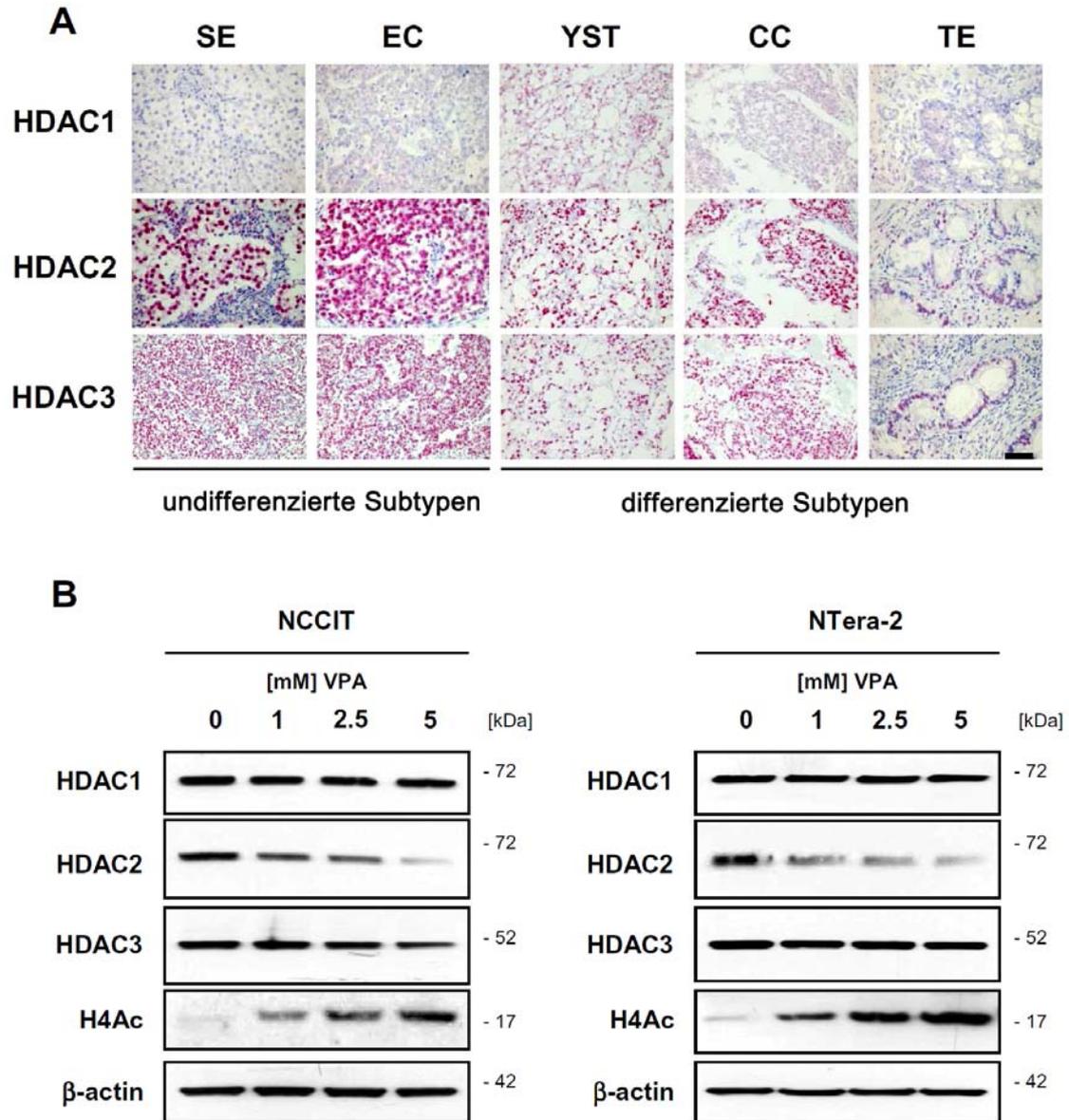
**Abb. 3.13: Korrelation der APP-Expression mit der Stammzellsignatur.** (A) Immunhistochemische Untersuchung von verschiedenen histologischen Keimzelltumor-Subtypen mit Primärantikörpern gegen APP (22C11), APLP2 (D2-II), Sox2 (AF2018), NANOG (H-155) und Oct-3/4 (C-10). Kongruent zur Expression der Stammzellsignatur war APP stark exprimiert in embryonalen Karzinomen (EC) und Sox2-negativen Seminomen (SE). Sowohl in differenzierten Dottersacktumoren (Yolk sac tumor, YST) als auch in Chorionkarzinomen (CC) und hoch-differenzierten Teratomen (TE), konnte nur eine schwache bis keine Expression von APP festgestellt werden. Im Gegensatz hierzu korrelierte die APLP2-Expression nicht mit der Stammzellsignatur. Semi-quantitative Darstellung der (B) APP-Expression und (C) der APLP2-Expression in verschiedenen Subtypen testikulärer Tumore durch den immunreaktiven Score-Index. (D) Sowohl in der Seminom- (TCam-2) als auch in embryonalen Karzinom- (NCCIT und NTera-2)-Zelllinie(n) konnte eine starke APP-Expression nachgewiesen werden. (E) Graphische Darstellung der densitometrisch gemessenen APP-Doppelbande in NTera-2-, NCCIT- und TCam-2-Zelllinien (n = 4). Statistische Unterschiede wurde durch eine one-way-ANOVA mit nachfolgender Bonferroni-post-hoc-Analyse errechnet und als \* für  $p < 0,05$  und \*\*\* für  $p < 0,001$  dargestellt. Balken, 200  $\mu\text{m}$ .

### 3.2.2 Expression und spezifische Modulation von Klasse-I-Histoneacetylasen in pluripotenten Keimzelltumoren

Lediglich eine Studie untersuchte die Rolle von HDAC1 in der physiologischen Spermatogenese und in testikulären Keimzelltumoren (Omisano et al., 2007). Daher sollte komplementär zu dieser Studie nun die Expressionsprofile von Klasse-I-HDAC-Enzymen (HDAC 1-3) untersucht werden. Konsistent zu den Ergebnissen von Omisano et al. (2007), konnte keine Expression von HDAC1 in undifferenzierten als auch in differenzierten Tumorsubtypen nachgewiesen werden. Lediglich im Chorionkarzinom konnte eine schwache, nukleäre Färbung festgestellt werden. Im Gegensatz dazu zeigte die Expressionsanalyse von HDAC2 ein komplett anderes Muster. Analog zu APP und der Stammzellsignatur konnten in Seminomen und embryonalen Karzinomen eine starke nukleäre HDAC2-Färbung nachgewiesen werden. In den differenzierten histologischen Subtypen zeigte sich eine graduelle Abnahme der HDAC2-Expression. Insbesondere im terminal differenzierten Teratom waren nur fokale Expressionen von HDAC2 detektierbar. In testikulären Keimzelltumoren war HDAC3 deutlich schwächer als HDAC2 exprimiert, zeigte aber dennoch ein ähnliches Expressionsmuster wie HDAC2. Diese Resultate führen zu der Annahme, dass die Expressionen von HDAC2 und HDAC3 während des Differenzierungsprozesses moduliert werden (Abbildung 3.15 A).

Als nächstes sollte untersucht werden, welchen Einfluss VPA auf die Expression der einzelnen HDAC-Isoenzyme hat. Dafür wurden die NCCIT- als auch die NTera-2-Zelllinie mit aufsteigenden Konzentrationen VPA (0 bis 5 mM) für 24 h behandelt. Anschließend wurden durch Western-Blot-Analysen die Expressionen von HDAC 1-3 untersucht. In beiden Linien konnte selektiv und konzentrationsabhängig die Expression von HDAC2 runterreguliert werden. Weder HDAC1 noch HDAC3 zeigten unter einer VPA-Behandlung

eine deutliche Änderung der Expressionspiegel. Die HDAC-inhibitorische Wirkung von VPA konnte durch eine dosisabhängige Zunahme an H4Ac validiert werden (Abbildung 3.15 B). In Übereinstimmung mit diesen Ergebnissen konnten Krämer et al. (2003) demonstrieren, dass VPA selektiv den proteosomalen Abbau von HDAC2 induziert, ohne dabei den Proteingehalt von HDAC1 und HDAC3 zu modulieren (Krämer et al., 2003).

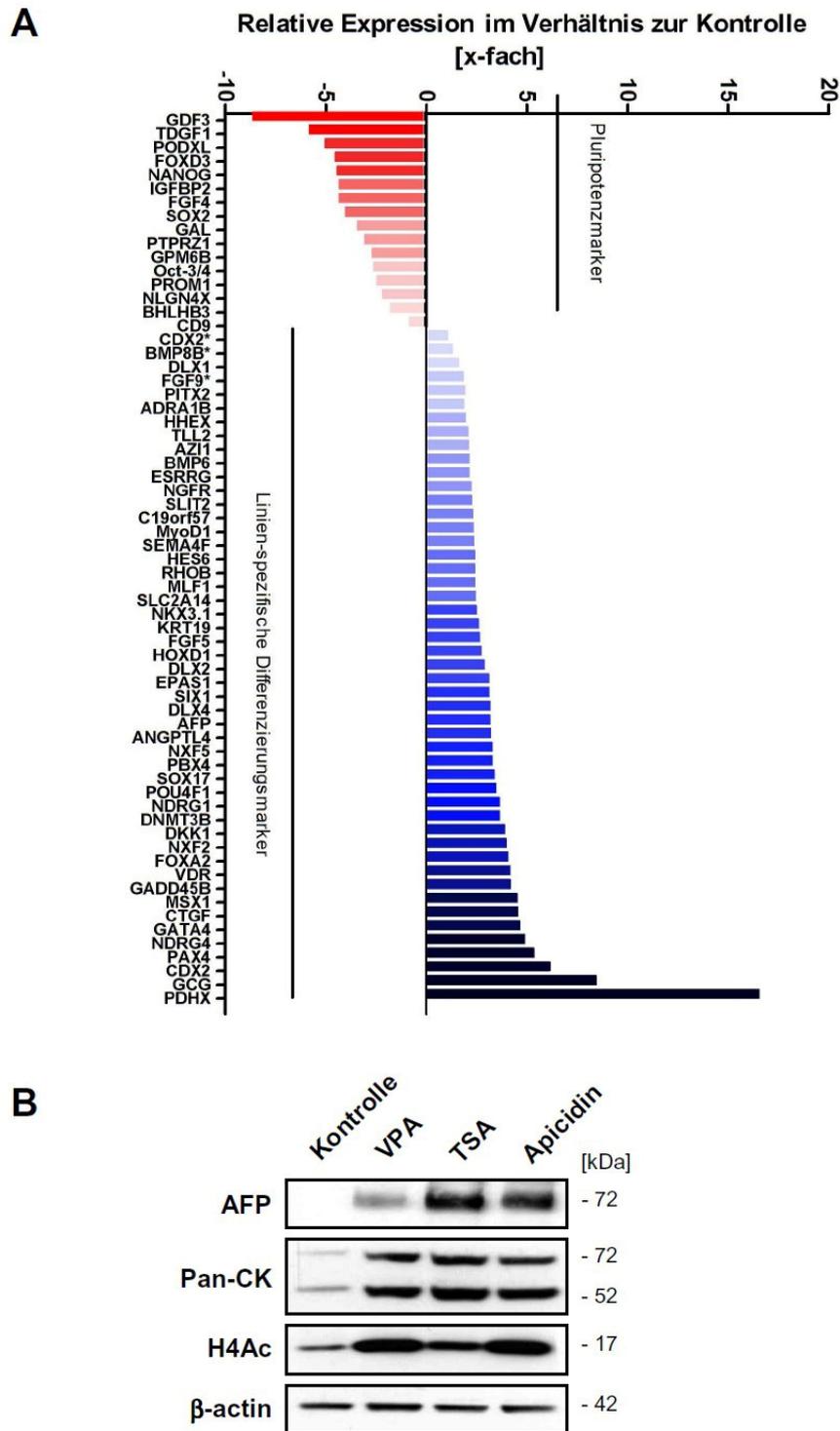


**Abb. 3.14: Expression und spezifische Modulation von Histondeacetylase-Enzymen in pluripotenten Keimzelltumoren.** (A) Repräsentativ gezeigt sind hier immunhistochemische Färbungen von Klasse-I-HDAC-Enzymen. Eine prägnante nukleäre HDAC2-Färbung konnte in undifferenzierten Seminomen (SE) und embryonalen Karzinomen (EC) beobachtet werden. In den extraembryonal differenzierten Dottersacktumoren (YST) und Chorionkarzinomen (CC) waren die Expressionspiegel deutlich niedriger. In den somatisch differenzierten Teratomen (TE) konnten nur fokale oder keine Expression von HDAC2 festgestellt werden. Wenn auch niedriger exprimiert, zeigte HDAC3 ein ähnliches Färbemuster in testikulären Tumoren. Verglichen hierzu waren in allen Subtypen keine deutlichen nukleären Färbungen von HDAC1 nachweisbar. (B) Beide EC-Zelllinien wurden mit aufsteigenden VPA-Dosen für 24 h inkubiert und anschließend die Expressionen von HDAC1-3 analysiert. Hier zeigte sich das VPA in beiden Linien selektiv HDAC2 reduzierte, ohne gleichzeitig HDAC1 und HDAC3 zu modulieren. Die effektive HDAC-Inhibierung wurde durch einen konzentrationsabhängigen Anstieg der H4Ac-Spiegel bestätigt. Zur Kontrolle gleich aufgetragener Proteinmengen wurde ein Antikörper gegen  $\beta$ -actin verwendet. Balken, 100  $\mu$ m.

### 3.2.3 Histondeacetylase-abhängige Induktion einer Differenzierung in pluripotenten Keimzelltumoren

Um den Einfluss von VPA auf die Genexpression von embryonalen Karzinomzellen zu überprüfen, wurde exemplarisch die NTERA-2 Zelllinie mit 5 mM VPA für 24 h behandelt und anschließend Gesamt-RNA isoliert. Die anschließende Microarray-Analyse wurde von Dres. L. Opitz und G.-S. Riesters (UMG Göttingen, Transkriptom Analyse Labor) durchgeführt und analysiert. Differenziell regulierte Gene die mindestens einen 2-fachen Expressionsunterschied (*Cut-off-Grenze*) aufwiesen wurden als Kandidat-Gene definiert. Unter einer VPA-Behandlung konnten insgesamt 1061 differenziell regulierte Kandidat-Gene identifiziert werden. Da der Fokus auf die HDAC-abhängige Modulation von Pluripotenz und der Differenzierungsinduktion gerichtet war, wurden differenziell regulierte Pluripotenz- und Differenzierungsgene durch nachfolgende RT-PCR-Analysen validiert. Dabei konnten 49 Linien-spezifische (ektodermale, entodermale und mesodermale) Differenzierungsmarker und 16 Pluripotenzmarker identifiziert werden. Durch das VPA konnten auf Transkriptionsebene unter anderem die potenten Stammzellgene Sox2, Oct-3/4 und NANOG runterreguliert werden. Ebenfalls konnte eine signifikante Hochregulation des entodermalen Differenzierungsmarkers AFP (alpha-Fetoprotein) und des ektodermalen Differenzierungsmarkers KRT19 (Zytokeratin 19) beobachtet werden (Abbildung 3.16 A).

Um die differenzielle Regulation dieser Markergene auf Proteinebene zu bestätigen, wurden NTERA-2-Zellen für 24 h mit 5 mM VPA stimuliert und nachfolgend Western-Blot-Analysen mit einem AFP (EP1016Y)- und dem Pan-CK-Antikörper (AE1/AE3, der ebenfalls Zytokeratin 19 erkennt) durchgeführt. Damit eine HDAC-Abhängigkeit der Differenzierungsinduktion validiert werden konnte, wurden parallel hierzu diese Zellen mit 500 nM TSA stimuliert. Als weiteren potenten HDAC-Inhibitor wurde das zyklische Tetrapeptid Apicidin verwendet. Im Gegensatz zum reversiblen Pan-HDAC-Inhibitor TSA inhibiert das Apicidin im hohen nanomolaren Bereich irreversibel Klasse-I-HDAC-Enzyme (HDAC1-3) (Han et al., 2000; Gallo et al., 2008). Abhängig von der Potenz, führten alle Inhibitoren zu einer deutlichen Induktion beider Differenzierungsmarker. Als Surrogatparameter einer effektiven HDAC-Inhibition wurde ein H4Ac-spezifischer Antikörper verwendet (Abbildung 3.16 B). Die Resultate der HDAC-abhängigen Modulation der Stammzellgene auf Proteinebene werden in Kapitel 3.2.4 besprochen.



**Abb. 3.15: HDAC-abhängige Induktion einer Differenzierung in pluripotenten Keimzelltumoren.** (A) Ntera-2 Zellen wurden für 24 h mit 5 mM VPA stimuliert. Anschließend wurde die Gesamt-RNA isoliert und eine Microarray-Analyse durchgeführt. Um die differenzielle Modulation von Pluripotenz- und Differenzierungsgenen darzustellen, wurden die insgesamt 65 Kandidat-Gene in einem Wasserfall-Diagramm graphisch wiedergegeben. Die mit einem Stern (\*) versehen Gene waren statistisch nicht signifikant, präsentierten dennoch eine Tendenz ( $p$ -Werte lagen zwischen 0,06 und 0,19). (B) Ntera-2 Zellen wurden mit 5 mM VPA, 500 nM TSA oder 1  $\mu$ M Apicidin für 24 h behandelt. Western-Blot-Analysen erbrachten den Nachweis, dass auch auf Proteinebene sowohl Pan-CK als auch AFP HDAC-abhängig induziert wurden. Der Beweis einer effektiven HDAC-Inhibition konnte durch induzierte H4Ac-Spiegel erbracht werden. Ein spezifischer Antikörper gegen  $\beta$ -actin diente als Ladekontrolle.

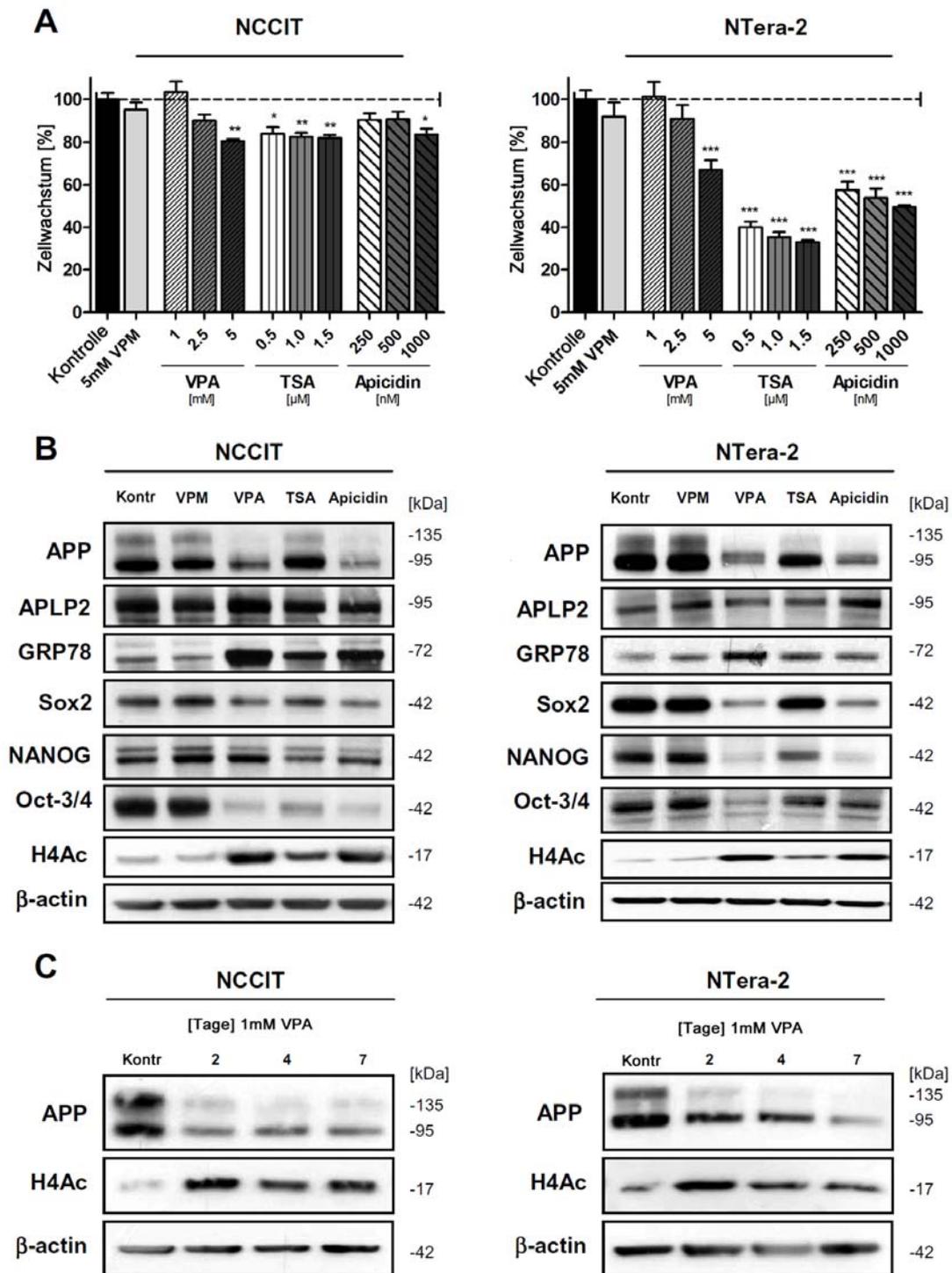
### **3.2.4 Inhibition von Histondeacetylasen führt zur gleichzeitigen Modulation von APP und der Stammzellsignatur**

Pluripotente, transformierten Karzinomzelllinien bieten als Modellsystem die einzigartige Möglichkeit sowohl die Beeinflussung der Stammzellsignatur (Oct-3/4, NANOG und Sox2), als auch des APP-Metabolismus zu untersuchen. Um den Einfluss und die Modulierbarkeit durch HDAC-Inhibitoren zu testen wurden, wie auch in Kapitel 3.1.10 beschrieben, NTera-2- und NCCIT-Zellen mit VPA, TSA oder Apicidin behandelt. Als Negativ-Kontrolle diente wieder das inaktive VPA-Analogon VPM. Zunächst wurden alle Substanzen auf ihre anti-proliferativen Eigenschaften untersucht. Dafür wurden die Zelllinien für 24 h stimuliert und anschließend die Proliferation durch einen MTS-Assay gemessen. Wie bereits in vorangegangenen Experimenten gezeigt, präsentierte VPM keine signifikanten Effekte auf das Zellwachstum. Alle anderen HDAC-Inhibitoren zeigten konzentrationsabhängig eine Proliferationsinhibition. Insbesondere die NTera-2-Zelllinie reagierte sensitiv auf die Stimulation mit HDAC-Inhibitoren (Abbildung 3.17 A).

Um weiter den Einfluss auf APP und Stammzellgen-Expressionen zu studieren, wurden beide Zelllinien entweder mit 5 mM VPA, 5 mM VPM, 500 nM TSA oder 1  $\mu$ M Apicidin für 24 h behandelt. Western-Blot-Analysen erfolgten mit Primärantikörpern gegen APP (W-02), APLP2 (D2-II) und GRP78 (C50B12) als auch gegen die Stammzellgene Sox2 (ab59776), NANOG (H-155) und Oct-3/4 (C-20). Die effektive HDAC-Inhibition wurde durch einen spezifischen Antikörper gegen H4Ac nachgewiesen. Konsistent zu den Ergebnissen der Transkriptom-Analyse konnte auch auf Proteinebene HDAC-abhängig die Stammzellgene NANOG, Sox2 und Oct-3/4 runterreguliert werden (Abbildung 3.17 B). Entsprechend dem propagierten Mechanismus konnte in beiden Zelllinien eine deutliche Induktion des GRP78 und die damit verbundene selektiven Suppression der APP-Proteinspiegel nachgewiesen werden.

In vorausgegangenen Experimenten wurden Kurzzeitexperimente mit hohen (unphysiologischen) VPA-Dosen (bis zu 5 mM) durchgeführt. Daher sollte im nachfolgenden Experiment untersucht werden, ob physiologische VPA Konzentrationen einen signifikanten Einfluss auf den APP-Metabolismus haben. Unter einer anti-epileptischen Behandlung mit VPA können im Patienten Serumkonzentrationen von 0,3 – 1 mM gemessen werden (Brodie & Dichter, 1996; Gottlicher et al., 2001; Loscher, 2002). Demzufolge wurden beide Zelllinien entweder mit 1  $\mu$ M VPA oder mit Medium (Kontrolle) für zwei bis sieben Tage (chronische Behandlung) inkubiert. Alle 24 h wurde das Medium durch frisches oder mit VPA versetztes

Medium ausgetauscht. Die Western-Blot-Analysen zeigten, dass durch chronisch-therapeutische VPA-Konditionen die Proteinspiegel von APP deutlich gesenkt werden konnten und bereits nach 48 h einen stabilen Zustand (*steady-state*) erreichten. Zeitgleich konnte auch eine konstante Induktion der H4Ac-Expression beobachtet werden (Abbildung 3.17 C).

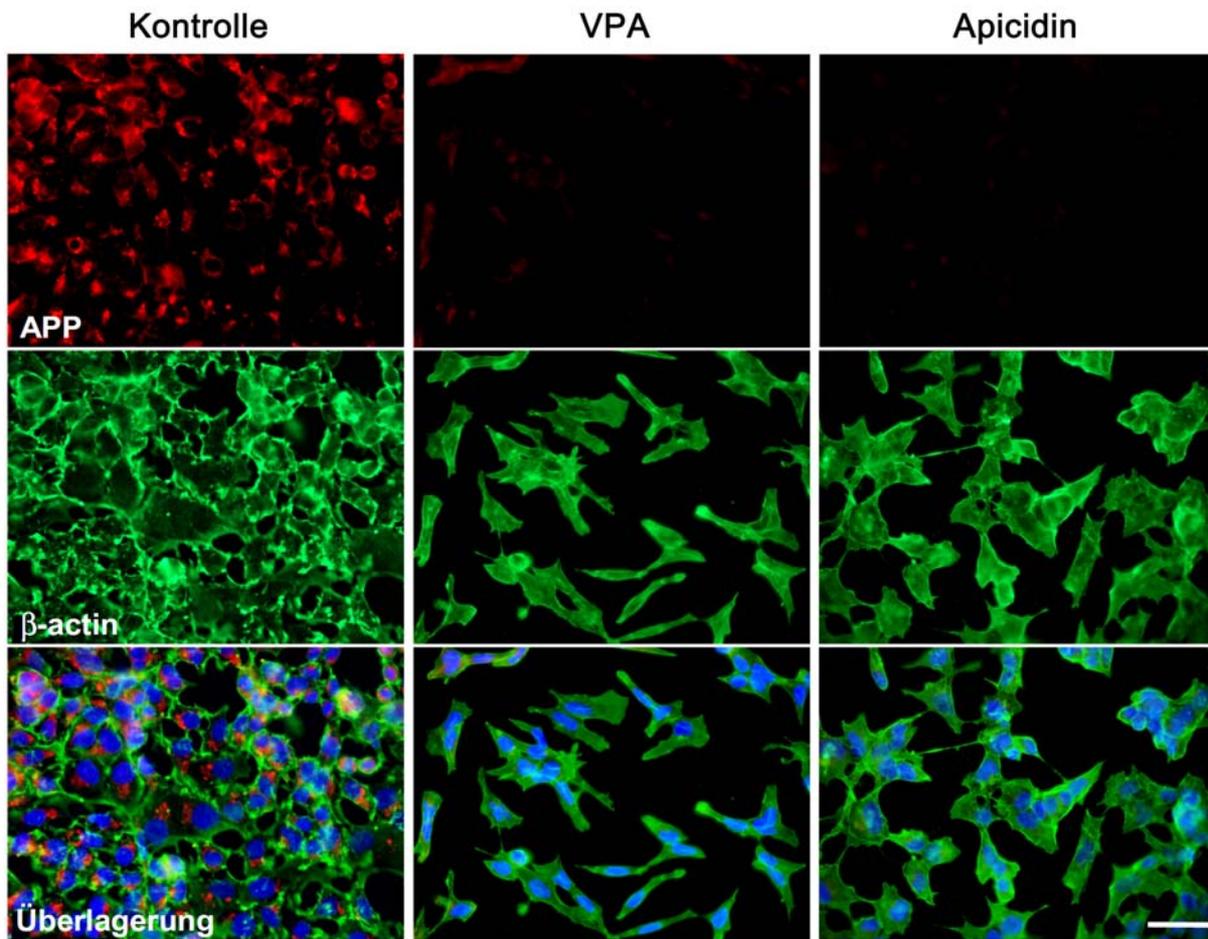


**Abb. 3.16: Inhibition von Histondeacetylasen führt zur gleichzeitigen Modulation von APP und der Stammzellsignatur.** (A) Beide Zelllinien wurden mit aufsteigenden Dosen VPA (1 – 5 mM), TSA (0,5 – 1,5 μM), Apicidin (250-1000 nM) oder mit 5 mM VPM behandelt. Medium behandelte Zellen dienen als Kontrolle. Mittels MTS-Assay wurde die Proliferation analysiert. (B) Um die HDAC-abhängige Modulation von APP und Stammzellgenen zu untersuchen, wurden beide Zelllinien mit entsprechenden Substanzen behandelt und Western-Blot-Analysen durchgeführt. Alle HDAC-Inhibitoren führten neben einer spezifischen Runterregulation von APP, ebenfalls zu einer Suppression von Stammzellmarkern (Sox2, NANOG und Oct-3/4). (C) Weiterhin wurden beide Zelllinien chronisch mit 1 μM VPA für zwei bis sieben Tage behandelt. Nach 48 h erreichten sowohl APP- als auch H4Ac-Proteinspiegel eine stabile Plateau-Phase. Die Ergebnisse des MTS-Assay (n = 6) wurden gemittelt und prozentual zur Kontrolle wiedergegeben. Statistische Unterschiede wurden durch eine one-way-ANOVA mit nachfolgender Bonferroni-post-hoc-Analyse errechnet und als \* für  $p < 0,05$ , \*\* für  $p < 0,01$  und \*\*\* für  $p < 0,001$  dargestellt.

### **3.2.5 Immunzytochemische Analysen und morphologische Veränderungen nach Inhibition von Histondeacetylasen**

In vorangegangenen Experimenten konnte der Nachweis erbracht werden, dass eine effektive Inhibition von HDAC mit einer Suppression von Stammzellgenen und der Induktion von gewebetypischen Differenzierungsmarkern einhergeht. Um die zellmorphologischen Veränderungen durch HDAC-Inhibitoren zu untersuchen, wurden N-Tera-2 Zellen in 4-well Chamber-Slides ausplattiert. Nachdem eine Konfluenz von 40-50% erreicht war, erfolgte eine 24-stündige Behandlung mit 5 mM VPA, 1  $\mu$ M Apicidin oder Medium (Kontrolle). Zur Detektion von APP wurde eine Immunzytochemie mit dem APP-spezifischen Antikörper 23850 durchgeführt. Parallel wurde ebenfalls ein  $\beta$ -actin-spezifischer Antikörper (Sigma) verwendet. Wie aus Abbildung 3.18 erkennbar, induzierte VPA neben einer Reduktion des APP auch zellmorphologische Veränderungen, die typische Merkmale differenzierter Zellen zeigten (spindelförmige Zellschrumpfung, zytoplasmatische Ausläufer und irregulär geformte Zellkerne). Unbehandelte Zellen hingegen zeichneten sich durch eine homogene Zellmorphologie aus.

Da eine Behandlung mit Apicidin mit ähnlichen differenzierungstypischen Veränderungen einherging, konnte konsistent auf einen HDAC-abhängigen Mechanismus geschlossen werden.

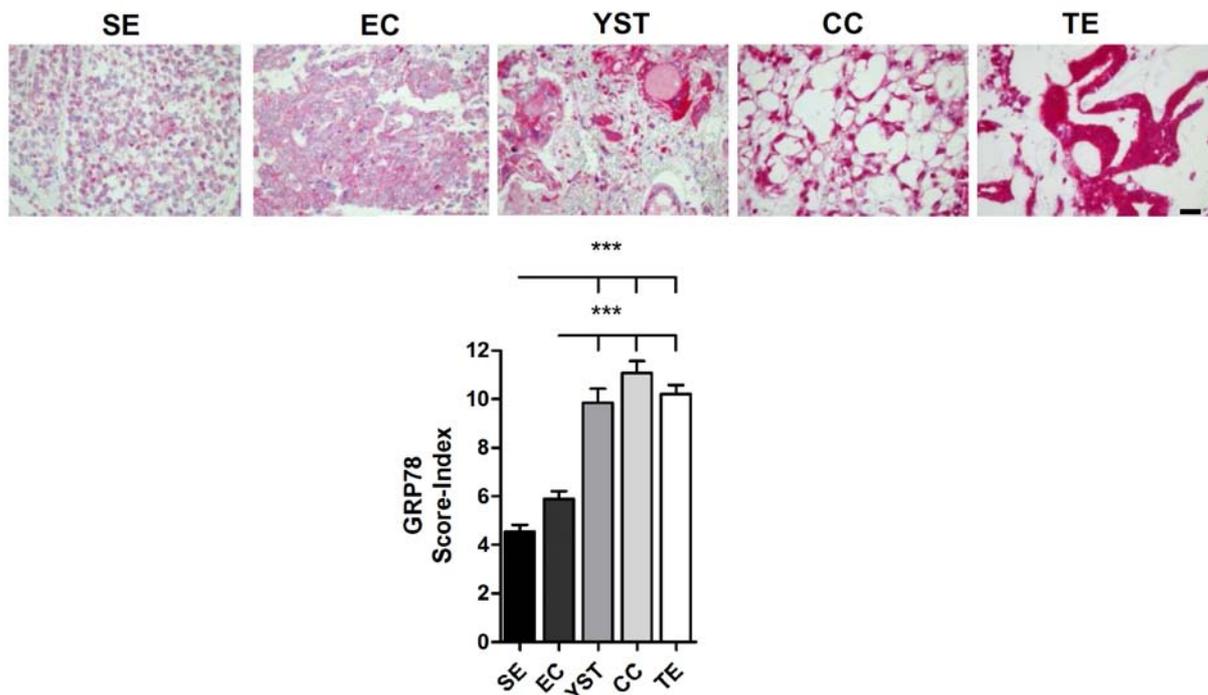


**Abb. 3.17: Immunzytochemische Analysen und morphologische Veränderungen nach VPA und Apicidin-Behandlung.** Ntera-2 Zellen wurden in Chamber-Slides ausplattiert. Nach 72 h wurde eine Konfluenz von 40-50% erreicht. Anschließend erfolgte die Behandlung mit induzierten HDAC-Inhibitoren (VPA und Apicidin) für weitere 24 h. Nach erfolgter Fixierung wurde das APP durch den Antikörper 23850 detektiert (rot). Zur Visualisierung des Zytoskeletts wurde ebenfalls ein  $\beta$ -actin-spezifischer Antikörper (grün) verwendet. Die Kerne wurden mit DAPI (blau) dargestellt. Beide HDAC-Inhibitoren reduzierten deutlich die APP-Spiegel und induzierten eine morphologische Zelldifferenzierung. Balken, 50  $\mu$ m.

### 3.2.6 Die inverse Beziehung zwischen APP- und GRP78-Expression *in vivo* und *in vitro*

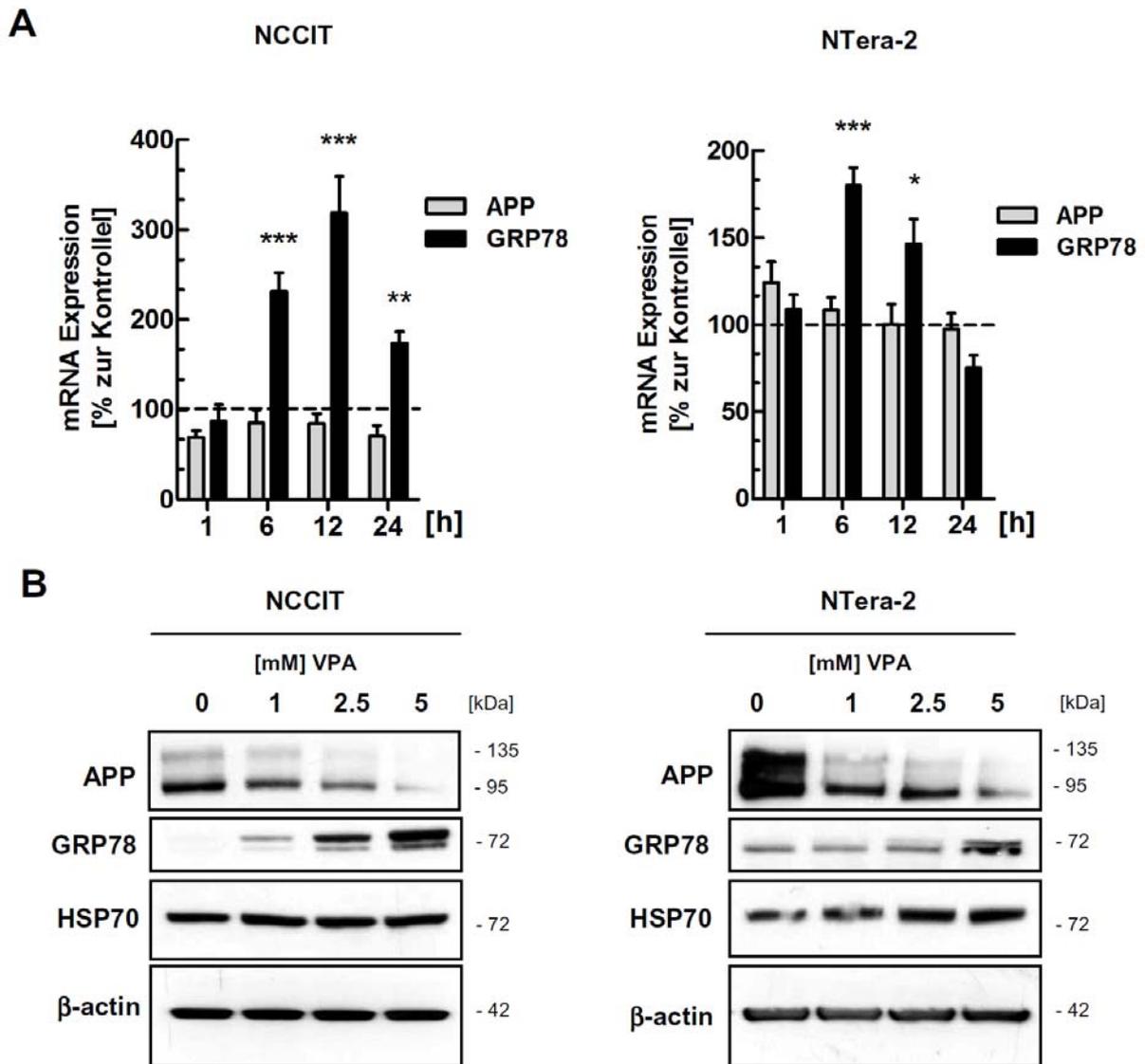
Wie bereits im Vorfeld gezeigt, konnte eine differenzielle APP-Expression in den verschiedenen Subtypen der testikulären Keimzelltumoren festgestellt werden (Kapitel 3.2.1). Bereits Skotheim et al. (2005) analysierten die Genexpressionprofile von testikulären Keimzelltumoren und konnten keinen signifikanten Unterschied der Genexpression des APP zwischen undifferenzierten und differenzierten Tumorsubtypen feststellen (Skotheim et al., 2005). Daher musste angenommen werden, dass während des Differenzierungsprozesses die Proteinspiegel des APP selektiv über einen post-translationalen Mechanismus runterreguliert

werden. Bereits *in vitro* konnte gezeigt werden, dass GRP78 über einen post-translationalen Regulationsmechanismus effektiv APP-Spiegel reduzieren kann. Um die Involvierung dieses APP-Interaktionsproteins *in vivo* im spontanen Differenzierungsprozess testikulärer Keimzelltumore zu studieren, wurden komplementär zur APP auch die GRP78-Expressionen in undifferenzierten und differenzierten Subtypen analysiert. Hierbei wurden TMAs mit einem spezifischen GRP78-Antikörper (ab21685) gefärbt und semi-quantitativ als immunreaktiver Score-Index wiedergegeben. Hier konnte eine interessante Beobachtung gemacht werden. Im Gegensatz zu undifferenzierten Subtypen (embryonales Karzinom und Seminom), die nur niedrige GRP78-Spiegel aufwiesen, konnten sowohl im differenzierten Chorionkarzinom, Dottersackkarzinom und im terminal differenzierten Teratomen signifikant höhere GRP78-Expressionen nachgewiesen werden (Abbildung 3.19). Dadurch konnte eine inverse Beziehung zwischen der Expression des APP und GRP78 in testikulären Keimzelltumoren festgestellt werden.



**Abb. 3.18: Induktion von GRP78 in differenzierten Subtypen testikulärer Tumore.** Repräsentativ gezeigt sind hier die immunhistochemischen Färbungen vom GRP78. Differenzierte Subtypen, wie das Chorionkarzinom (CC), Dottersackkarzinom (YST) und das terminal differenzierte Teratom (TE) zeigten ein prägnantes Färbemuster. Im Gegensatz hierzu konnte in pluripotenten embryonalen Karzinomen (EC) als auch in Seminomen (SE) nur eine schwache GRP78-Expression festgestellt werden. Die Semi-quantifizierung der GRP78-Färbungen wurde durch den immunreaktiven Score-Index wiedergegeben und bestätigte einen hoch-signifikanten Unterschied zwischen differenzierten und undifferenzierten Subtypen. Statistische Unterschiede wurden durch eine one-way-ANOVA mit nachfolgender Bonferroni-post-hoc-Analyse errechnet und als \*\*\* für  $p < 0,001$  dargestellt. Balken, 200  $\mu\text{m}$ .

Da eine HDAC-Inhibition mit der Induktion einer Differenzierung einhergeht, wurden die Expressionen von GRP78 in embryonalen Karzinomzelllinien untersucht. Interessanterweise zeigte eine 24-stündige Stimulation mit VPA in der NTERA-2-Zelllinie keine signifikante Änderung der GRP78 mRNA. Ebenfalls konnte in der Transkriptomanalyse keine differentielle Regulation der GRP78-Genexpression festgestellt werden. Daher wurde erneut die GRP78-Transkription zu vier unterschiedlichen Behandlungszeitpunkten bestimmt (1 h, 6 h, 12 h und 24 h). Ebenfalls wurde im gleichen Versuch auch die APP mRNA analysiert. Es konnte festgestellt werden, dass durch VPA transient die Genexpression des GRP78 induziert wurde. Bereits nach 6 h konnte eine signifikante Regulation nachgewiesen werden. Diese Effekte konnten in einer zweiten Zelllinie (NCCIT) reproduziert werden. Zu keinem Zeitpunkt konnte eine signifikante Änderung der APP mRNA beobachtet werden. Um die HDAC-abhängige Induzierbarkeit auf Proteinebene zu untersuchen, wurden beide Zelllinien mit aufsteigenden VPA-Dosen für 24 h stimuliert und via Western-Blot-Analysen APP- und GRP78-Expressionen untersucht. Konsistent zu vorherigen Ergebnissen konnte konzentrationsabhängig das APP reduziert und GRP78-Level hochreguliert werden. Die ebenfalls analysierte Expression des HSP70 (*heat shock protein 70*) wies unter der Behandlung keine Änderungen auf. Damit konnte auch in testikulären Keimzelltumoren bestätigt werden, dass durch eine HDAC-Inhibition selektiv GRP78 reguliert wird ohne gleichzeitig homologe Chaperone zu modulieren.



**Abb. 3.19: Inverse Beziehung zwischen APP und GRP78 in vitro.** (A) Nachdem NCCIT- und NTera-2-Zellen mit 5 mM VPA stimuliert wurden, erfolgte zu unterschiedlichen Zeitpunkten die Isolation von Gesamt-RNA. Anschließend wurden RT-PCR-Analysen mit APP- und GRP78-spezifischen Primern durchgeführt. Die Normalisation erfolgte durch das ARP (Acidic Ribosomal Protein). Die Resultate ( $n = 3$ ) wurden gemittelt und prozentual zu unbehandelten Kontrollen (Zeitpunkt 0 h) wiedergeben. (B) Nach einer Stimulation mit aufsteigenden VPA-Dosen erfolgten Western-Blot-Analysen mit APP (W-02)- und GRP78 (C50B12)-spezifischen Antikörpern. Eine selektive Regulation des GRP78 konnte durch die Analyse des HSP70 (C45G5) bestätigt werden. Als Ladekontrolle diente  $\beta$ -actin. Statistische Unterschiede wurde durch eine two-way-ANOVA mit nachfolgender Bonferroni-Korrektur errechnet und als \* für  $p < 0,05$ , \*\* für  $p < 0,01$  und \*\*\* für  $p < 0,001$  dargestellt.

### 3.2.7 *In-vivo*-Therapiestudie: Applikation von Valproat zur Behandlung von NTERA-2-Xenograft-Mäusen

Die Implantation von Tumorzelllinien in immundefizienten Mäusen führt zur Ausbildung der jeweiligen Tumorentität *in vivo* und wird daher als ein legitimes und wertvolles Modell zur Validierung potentieller Krebsmedikamente angesehen.

Nach erfolgreichem Testen von VPA hinsichtlich der effektiven Reduktion von APP und der Proliferation *in vitro*, wurde die Wirksamkeit *in vivo* in einem NTERA-2-Xenograft-Modell untersucht. Bei der Therapiestudie mit VPA kamen zwei Therapiemodalitäten zum Einsatz. Insgesamt wurden 45 Tiere in drei große Gruppen (jeweils  $n = 15$ ) aufgeteilt.

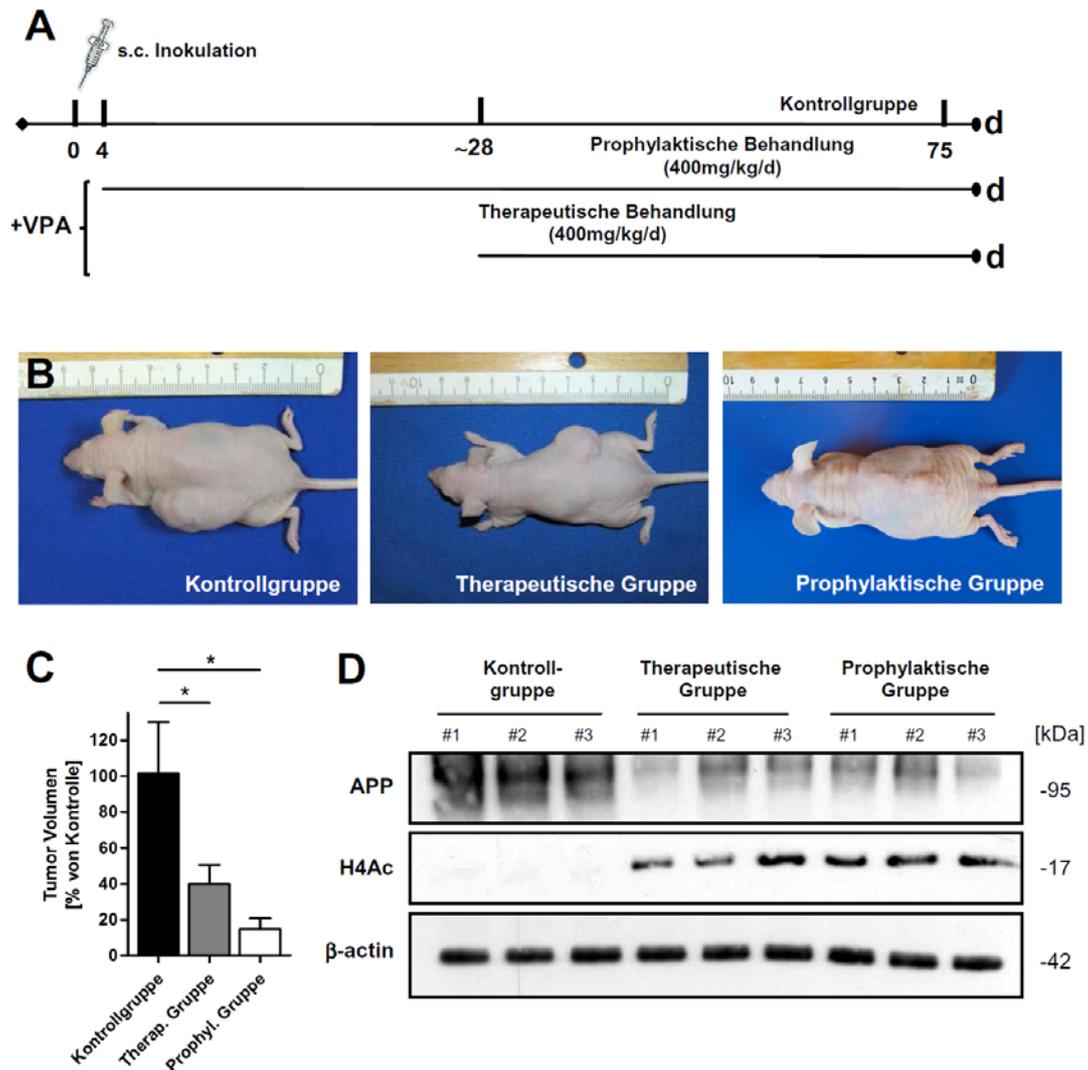
(Abbildung 3.21 A):

- A) Prophylaktische Gruppe: Um das chemopräventive Potential von VPA hinsichtlich der Induzierbarkeit von Tumoren zu untersuchen, wurde ab dem vierten Tag nach der Inokulation von Tumorzellen symptomfreien Mäusen jeweils 400 mg/kg KG/Tag VPA oral via Trinkwasser appliziert.
- B) Therapeutische Gruppe: Um das therapeutische Potential von VPA für NTERA-2-Xenografts zu untersuchen, wurden den Tieren mit voll ausgebildeten Tumoren (ungefähr 28 Tagen *post inoculationem*) jeweils 400 mg/kg KG/Tag VPA oral via Trinkwasser appliziert.

Die Tiere in der Kontrollgruppe hatten lediglich Zugang zu normalen Trinkwasser. Die Messungen des Gewichts als auch das Tumolvolumen wurden zweimal pro Woche gemessen. Um die Effektivität verwendeter VPA Dosen nachzuweisen wurden intermittierend VPA im Serum bestimmt (30 – 300  $\mu\text{mol/l}$ ). Alle Tiere wurden nach 75 Tagen nach der Inokulation sakrifiziert. Anschließend wurden die Volumina bestimmt und die Tumore herausoperiert. Ein Teil der Tumore wurde sofort in flüssigen Stickstoff überführt und bis zu weiteren Proteinanalyse bei  $-80^{\circ}\text{C}$  gelagert. Der andere Teil wurde in 10 % Formalin fixiert und für eine histologische Begutachtung aufbereitet.

Die Analyse der Tumorumfänge zwischen den drei Gruppen zeigte, dass beide Behandlungsregime einen signifikanten Effekt auf das Tumorstadium hatten. Verglichen zu den unbehandelten Kontrollen (Trinkwasser), zeigte die therapeutische Applikation von VPA ein um  $61 \pm 28.3\%$  reduziertes Wachstum. Ein deutlicher Behandlungseffekt konnte durch eine prophylaktische Behandlung mit VPA beobachtet werden. Am Ende der Behandlung konnte eine Reduktion des Tumorstadiums um  $87 \pm 22.8\%$  verzeichnet werden (Abbildung 3.21 B).

Im nächsten Experiment wurden die Tumore lysiert und das Gesamt-Protein isoliert. Um einen Einblick in die Effektivität der hier eingesetzten Therapieschemata zu gewinnen, wurden zunächst durch Western-Blot-Analysen die Spiegel an hyperacetylierten Histone (H4Ac) bestimmt. Im Vergleich zu unbehandelten Kontroll-Tieren zeigten alle VPA-behandelten Tiere eine deutliche Akkumulation von H4Ac. Nachfolgend wurden Western-Blot-Analysen mit dem APP-spezifischen Antikörper 22C11 durchgeführt. Konsistent zu vorangegangenen *in-vitro*-Analysen konnte unter einer VPA-Behandlung deutlich die Expression von APP reduziert werden. Zwischen beiden Behandlungsmodalitäten konnte kein Unterschied im Proteingehalt von APP beobachtet werden (Abbildung 3.21 D).



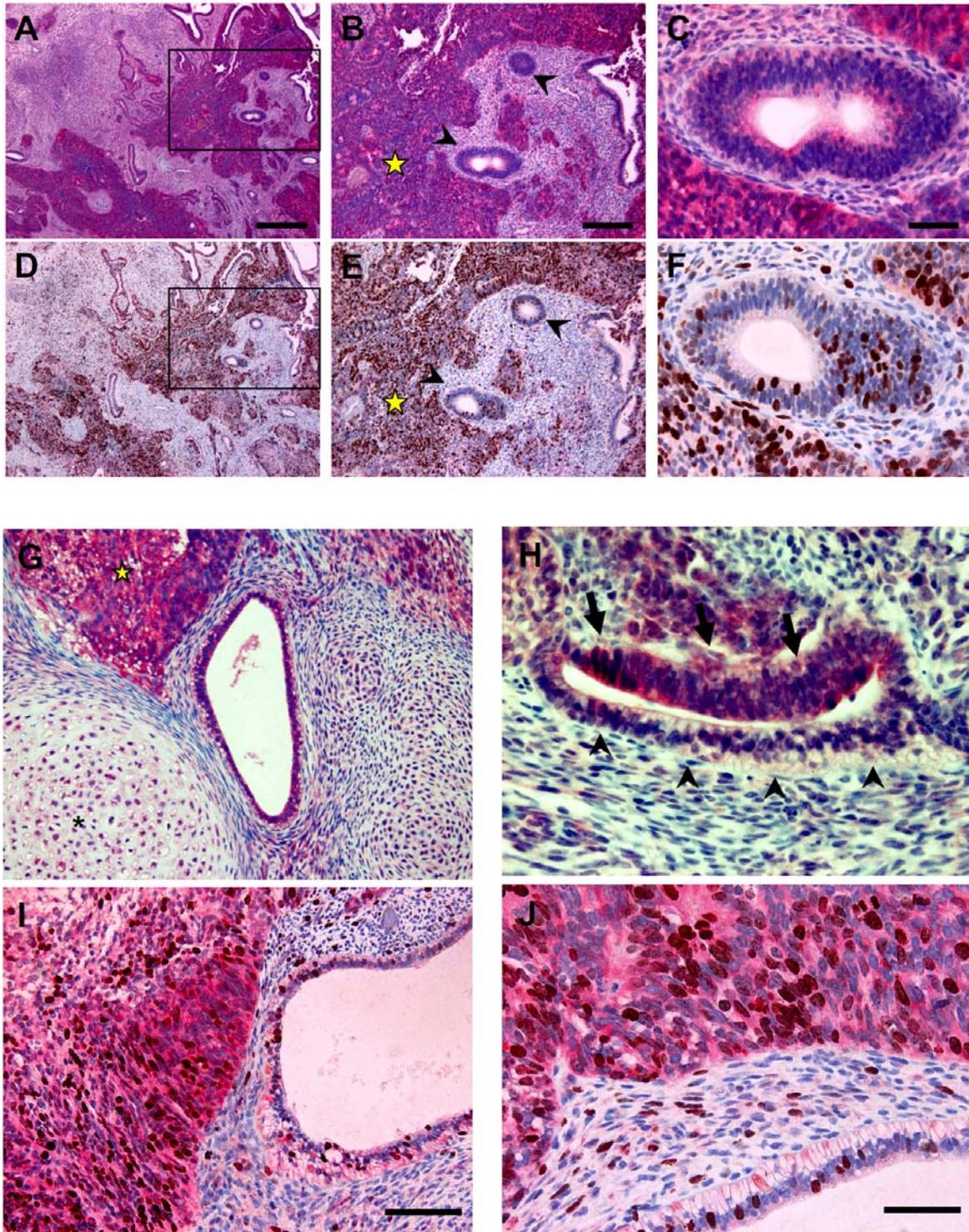
**Abb. 3.20: Behandlung von Ntera-2-Xenograft-Mäusen mit VPA.** (A) Schematische Darstellung des Versuchsablaufs. Insgesamt wurden 45 Tiere in drei gleich große Gruppen aufgeteilt: Die prophylaktische, therapeutische und die Kontroll-Gruppe. Die Behandlung mit VPA erfolgte oral über das Trinkwasser (400 mg/kg KG/Tag). Die Kontroll-Tiere bekamen nur normales Trinkwasser. (B) Repräsentative Abbildung von Kontroll- und behandelten Mäusen nach der Sakrifizierung. (C) Graphische Darstellung der Tumorumfängen von Kontrollen, prophylaktisch und therapeutisch behandelten Mäusen ( $n = 15$ ). Die Volumina wurden prozentual zur unbehandelten Kontrolltieren wiedergegeben. Die one-way-ANOVA-Analyse ergab signifikante Unterschiede unter den verschiedenen Gruppen ( $p < 0,005$ ). Ein nachfolgender unpaarer  $t$ -Test zeigte einen signifikanten Unterschied zwischen der Kontrollgruppe und der prophylaktischen Gruppe ( $p = 0,01$ ). Ebenfalls konnte zwischen der therapeutischen Gruppe und der Kontrollgruppe eine Signifikanz von  $p < 0,05$  errechnet werden. (D) Nachdem die Tumore lysiert und Proteine isoliert wurden, erfolgten Western-Blot-Analysen mit dem APP-Antikörper 22C11. Hier zeigte sich eine deutliche Reduktion der APP-Level unter einer VPA Behandlung. Die Validation einer effektiven HDAC-Inhibition erfolgte durch einen spezifischen Antikörper gegen H4Ac. Zur Normalisierung wurde ein Antikörper gegen  $\beta$ -actin verwendet. Alle Ergebnisse wurden als Mittelwert  $\pm$  SEM dargestellt. Das Signifikanzniveau wurde durch eine one-way-ANOVA-Analyse und nachfolgend durch einen unpaaren- $t$ -Test Analyse errechnet (\*,  $p < 0,05$ ).

### **3.2.8 Immunhistochemische Analyse der APP-Expression im Xenograft-Modell**

Um die Tumore histologisch zu begutachten, wurden diese gleich nach Explantation fixiert, in Paraffin eingebettet und histologisch aufgearbeitet. Die implantierten Tumore zeigten eine einzigartige pleomorphe Histologie, die nahezu alle Merkmale humaner Teratome reflektierte. Umgeben von Bindegewebe konnten zu Inseln oder soliden Strängen formierte undifferenzierte, pluripotente Zellhaufen nachgewiesen werden. Neben hoch-differenzierten epithelialen und glandulären Strukturen, die am ehesten hochprismatischen respiratorischen Epithel oder primitiver gastroenterstinaler Schleimhaut gleicheten, konnten auch mesenchymale Formationen in Form embryonalen Knorpel, sowie glatte und gestreifte Muskulatur identifiziert werden.

Um eine differenzielle APP-Expression nachzuweisen, erfolgten anschließend immunhistochemische Analysen mit dem APP-Antikörper 22C11. Alle untersuchten Teratome zeigten einen klaren Zusammenhang zwischen dem APP-Färbemuster und dem Grad der Differenzierung auf. Undifferenzierte, pluripotente Zellen zeigten eine starke zytoplasmatische Expression von APP. Hingegen konnte in den unterschiedlich differenzierten Zelltypen, wie terminal differenziertem Epithel, Drüsengewebe, Stroma und Knorpel nur niedrige oder keine APP-Färbung detektiert werden (Abbildung 3.23 G). Konsistent hierzu konnte eine Kolo-kalisation mit dem Proliferationsmarker Ki-67 (MIB1) durch die Anfertigung von Serienschnitten und Doppelimmunfärbungen nachgewiesen werden. Dadurch konnte gezeigt werden, dass eine deutliche Korrelation zwischen dem Proliferationsstatus pluripotenter Zellen und der Expression vom APP besteht (Abbildungen 3.23 A-F, I und J).

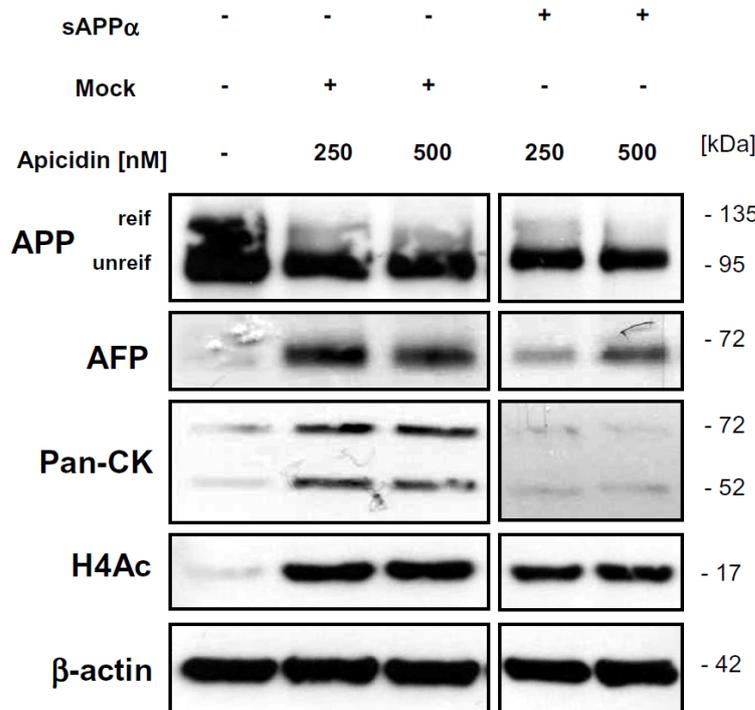
Zusammengefasst spiegelten sowohl die histologische Zusammensetzung als auch das charakteristische APP-Färbemuster des Xenograft-Modells exakt die Ergebnisse, die von der Analyse der humanen testikulären Keimzelltumore erhoben worden sind.



**Abb. 3.21: Immunohistochemische Analyse der APP-Expression im Xenograft-Modell.** (A-F) Immunohistochemische Analysen von Serienschritten mit dem APP-Antikörper 22C11 (A - C) und dem Proliferationsmarker Ki-67(MIB1) (D - F). Im undifferenzierten Tumorgewebe (Stern) konnten sowohl eine starke Expression von APP (rot) als auch von Ki-67 (braun) detektiert werden. Im Gegensatz konnte in hoch-differenzierten epithelialen Formationen (Pfeilspitze) und umgebenden Stromagewebe nur eine schwache Expression beider Marker nachgewiesen werden. (G) Immunohistochemische APP-Färbung in undifferenzierten Tumoren (Stern), embryonalem Knorpel (\*), epithelialen Strukturen und umgebenden Bindegewebe. (H) Übergang vom niedrig-differenzierten Epithel (Pfeile) in hoch-differenziertes einreihiges Epithel (Pfeilspitzen). Konsistent hierzu konnte eine graduelle Abnahme der APP-Expression festgestellt werden. (I und J) Die Doppelfärbung mit Ki-67 (braun) und APP (rot) zeigte nur im undifferenzierten, proliferativ-aktiven Gewebe eine starke Kollokalisation. Balken, A, D, 500  $\mu\text{m}$ ; B, E, G, I 200  $\mu\text{m}$ ; C, F, H, J 50  $\mu\text{m}$ .

### 3.2.9 Revertierung der HDAC-induzierten Differenzierung durch sekretiertes APP in Keimzelltumoren *in vitro*

Im Kapitel 3.1.12 konnte nachgewiesen werden, dass die exogene Addition von sAPP $\alpha$  vollständig den HDAC-induzierten Wachstumsarrest kompensierte. Nun stellte sich die Frage, ob die Induktion von Differenzierungsmarker durch parallele Addition von sAPP $\alpha$  revertiert bzw. verhindert werden kann. Um diese Hypothese zu überprüfen, wurden Ntera-2-Zellen entweder konditioniertes Medium von SH-SY5Y APP695<sub>wt</sub>- oder Mock-transfizierten Zellen hinzugefügt und für 24 h mit aufsteigenden Konzentrationen Apicidin behandelt. Anschließend wurden die Zellen lysiert und Gesamt-Proteine isoliert. Die Analyse von Pan-CK (ektodermaler Differenzierungsmarker) und AFP (entodermaler Differenzierungsmarker) zeigte, dass durch die Addition von sAPP $\alpha$  partiell die Induktion von AFP und sogar vollständig die Induktion von Pan-CK inhibieren werden konnte. Weiterhin wurden auch die Spiegel von APP und H4Ac zwischen beiden Konditionen untersucht. Verglichen zur unbehandelten Kontrolle wurden unter beiden Konditionen gleichermaßen APP und H4Ac moduliert. Somit konnte nachgewiesen werden, dass die Potenz und Effektivität von Apicidin nicht durch die Präsenz des konditionierten Mediums abgeschwächt wurde (Abb. 3.23).



**Abb. 3.22: Revertierung der HDAC-induzierten Differenzierung durch sAPP $\alpha$ .** Ntera-2 Zellen wurden unter zwei Konditionen (sAPP $\alpha$  und Mock-Kontroll-Medium) mit aufsteigenden Dosen Apicidin (250 und 500 nM) für 24 h behandelt. Als weitere Kontrolle wurden Zellen nur mit Medium inkubiert. Die Analyse der Differenzierungsmarker AFP und Pan-CK zeigte, dass unter gleichzeitiger Behandlung mit sAPP $\alpha$  die Induktion entsprechender Marker deutlich reduziert wurde. Als Ladekontrolle wurde  $\beta$ -actin verwendet.

---

## 4. Diskussion

Die Diskussion gliedert sich in vier Teile. Zunächst werden im Kapitel 4.1 die Ergebnisse im Hinblick auf die Funktion des APP als physiologischer Wachstumsfaktor sowie die Relevanz in malignen Tumoren diskutiert. Der zweite Abschnitt (Kapitel 4.2) behandelt die epigenetische Modulierbarkeit des APP-Metabolismus durch HDAC-Inhibitoren und beleuchtet den molekularen Mechanismus. Im Kapitel 4.3 werden sowohl die Bedeutung des APP als molekularer Biomarker von pluripotenten Keimzelltumoren als auch die damit verbundenen Konsequenzen erörtert. Anschließend wird auf die Differenzierungsinduktion durch HDAC-Inhibitoren und deren Modulierbarkeit durch sAPP $\alpha$  und auf die Resultate der *in-vivo*-Therapiestudie eingegangen. Abschließend wird im Kapitel 4.4 noch einmal ein kurzes Resümee gezogen und ein Ausblick in zukünftige Studien beleuchtet werden.

### 4.1 Die physiologischen und pathophysiologischen Funktionen des APP

Es besteht kein Zweifel, dass die Prozessierungsprodukte des APP eine essentielle Rolle bei der Entstehung der familiären und sporadischen Alzheimer-Erkrankung spielen (Bayer et al., 1999; Selkoe, 2001). Seit der Klonierung des APP im Jahr 1987 beschäftigte sich die Alzheimer-Forschung mit der Frage der biologischen Funktion dieses Proteins (Kang et al., 1987). Trotz alledem sind bis zum heutigen Tag weder die Struktur noch die Funktionen des APP vollständig aufgeklärt. Über Strukturanalysen mit Hilfe von Röntgenstrahlen und NMR (*nuclear magnetic resonance*) konnten Teilstrukturen des APP bestimmt und charakterisiert werden (Rossjohn et al., 1999; Barnham et al., 2003; Dulubova et al., 2004; Wang Y & Ha, 2004; Dahms et al., 2010). So konnte nachgewiesen werden, dass die Röntgenkristallstruktur des APP eine Wachstumsfaktor-ähnliche Domäne (von Aminosäureposition 28-123) beinhaltet. Diese Cystein-reiche Domäne beinhaltet eine spezifische Heparin-Bindungsstelle, interagiert mit Glykosaminoglykanen und aktiviert bei korrekter Ausbildung von intramolekularen Disulfidbrücken die MAP-Kinasen (Greenberg et al., 1995; Rossjohn et al., 1999). Bedingt durch die Ähnlichkeit zu MDK (*midkine*), VEGF (*vascular endothelial growth factor*) und insbesondere zum HGF (*hepatocyte growth factor*) kann das APP als Mitglied der „*cysteine rich growth factor*“-Familie angesehen werden (Rossjohn et al., 1999).

#### 4.1.1 Die physiologische Funktion des APP als potenter Wachstumsfaktor

Zur Untersuchung der wachstumsfördernden Eigenschaften des APP wurden in der vorliegenden Arbeit drei verschiedene Zellkultursysteme (SH-SY5Y, COS und CHO) verwendet. Die stabilen Transfektanten exprimierten konstitutiv sowohl die neuronale (APP695<sub>wt</sub>) als auch die nicht-neuronale (APP751<sub>wt</sub>)-Isoform. Damit konnten zum einen Langzeituntersuchungen durchgeführt werden sowie individuelle Unregelmäßigkeiten, wie sie mitunter bei transienter Transfektion auftreten, verhindert werden. Die Überexpression von APP führte unabhängig vom Zellkultursystem zu einer signifikanten Steigerung der Proliferation. Im Vergleich zu Mock (Leervektor)-transfizierten Zellen, konnte eine Überexpression des SPA4CT-Konstrukt (Deletion der N-terminalen APP-Domäne) keine Proliferationssteigerung bewirken. Hingegen konnte die Addition von konditioniertem Medium von APP-überexprimierenden Zellen sowohl in Mock- als auch in SPA4CT-transfizierten Zellen signifikant das Wachstum steigern. Hierdurch konnte verdeutlicht werden, dass die extrazelluläre N-terminale Domäne essentiell für die wachstumsfördernde Funktion ist. Weiterhin konnte auch nachgewiesen werden, dass sAPP $\alpha$  nicht nur als autokriner, sondern auch als parakriner Wachstumsfaktor fungieren kann.

Durch die weitere Untersuchung des SPA4CT $\Delta$ cyto-Modells konnte auch gezeigt werden, dass die Generierung und intrazelluläre Akkumulation von A $\beta$ -Peptiden mit einer Einschränkung der Zellviabilität verbunden ist. Interessanterweise konnte sAPP $\alpha$  in diesen Zellen keine Proliferationssteigerung auslösen. Dass nicht nur die Sekretion, sondern auch die intrazelluläre Akkumulation von A $\beta$ -Peptiden dramatische Konsequenzen nach sich zieht, konnte sowohl *in vitro* als auch durch transgene-Mausmodelle bewiesen werden (Maruyama et al., 1995; Bayer et al., 2004; Casas et al., 2004). Esposito et al. (2004) konnten einen Zusammenhang zwischen intrazellulärem A $\beta$  und einer p53-vermittelten Apoptose feststellen (Esposito et al., 2004). Welche molekularen Vorgänge in transgenen Mausmodellen die Neurodegeneration auslöst ist derzeit noch nicht vollständig aufgeklärt.

Mehrere *in-vitro*-Studien zeigten, dass durch sAPP $\alpha$  wachstumsassoziierte Signalkaskaden induziert werden. So konnte bereits demonstriert werden, dass sekretiertes APP über das p21ras-(*rat sarcoma*) Protein MAP-(*mitogen-activated protein*) Kinase-Signalwege, PKC (*protein kinase C*) oder PI3K (*phosphatidylinositol-3-kinase*) aktivieren kann (Greenberg et al., 1994; Greenberg et al, 1995; Ishiguro et al., 1998; Cheng G et al., 2002). Ob diese Effekte von sAPP $\alpha$  durch einen Rezeptor vermittelt werden und ob in nicht-neuronalen Zellen die

gleichen Signaltransduktionskaskaden durch sAPP $\alpha$  moduliert werden, ist noch Gegenstand aktueller Forschung.

### **4.1.2 Einfluss des APP auf die Biologie maligner Tumoren**

In einer aktuellen epidemiologischen Studie konnte festgestellt werden, dass Krebs-Patienten offenbar vor einer Alzheimer-Erkrankung geschützt sind. Ebenfalls konnte gezeigt werden, dass Alzheimer-Patienten signifikant weniger an malignen Tumoren erkranken. Diesen weltweit diskutierten wechselseitigen Zusammenhang zwischen Krebs und Alzheimer stellten erstmalig Forscher der Washington-Universität in St. Louis fest. Interessanterweise konnte die Arbeitsgruppe um Catherine Roe keinen Zusammenhang zwischen Tumorerkrankungen und vaskulären Demenzen finden. Daher vermuteten sie, dass eine spezifische molekulare Verbindung zwischen der Alzheimer-Erkrankung und der Krebsentstehung besteht (Roe et al., 2009).

In dieser Dissertation konnten deutliche Hinweise gefunden werden, dass jenes APP nicht nur in der Alzheimer-Pathogenese eine wichtige Schlüsselrolle spielt, sondern auch in verschiedenen malignen Tumoren überexprimiert vorliegt und unterschiedlich verarbeitet wird. Im Gegensatz zur Alzheimer-Pathogenese, in der eine Fehlprozessierung des APP zu vermehrten neurotoxischen A $\beta$ -Peptiden führt, wird in malignen Tumoren das APP zu sAPP $\alpha$  verarbeitet. Die sezernierte, lösliche Ektodomäne von APP (sAPP) fungiert als potenter autokriner und parakriner Wachstumsfaktor für Tumorzellen.

Tumorzellen sind gekennzeichnet durch eine Störung des Gleichgewichts zwischen Proliferation, Differenzierung und Apoptose. Einen wichtigen Bestandteil, insbesondere in der Tumorprogression, stellen Wachstumsfaktoren dar (Hanahan & Weinberg, 2000). Um die Stellung und Relevanz des APP in malignen Tumoren festzustellen wurden in dieser Arbeit initial zwei gastrointerstinale Tumore untersucht: das Kolonadenokarzinom und das Adenokarzinom des Pankreas. In beiden Tumorentitäten konnte immunhistochemisch eine deutliche Überexpression des APP in malignem entartetem Gewebe festgestellt werden. Hingegen zeigten sowohl gesundes Kolon- als auch Pankreasgewebe nur eine schwache oder keine APP-Expression. Dadurch ergibt sich auch die Möglichkeit APP als neuen immunhistochemischen Marker für maligne entartetes Gewebe zu verwenden.

Ein interessanter Nebenbefund konnte im Pankreasgewebe beobachtet werden. Im Gegensatz zu normalen duktalem Ausführungsgängen, Drüsenzellen (Azini) und umgebenden gesunden

Bindegewebe, zeigten die Langerhans-Inseln (Hormon bildende Zellen) eine kräftige APP-Expression. Ähnliche Beobachtung konnten auch von Hansel et al. (2003) gemacht werden (Hansel et al., 2003).

Bislang ist nur wenig bekannt über die biologische Funktion des APP in nicht-neuronalen Zellen. Durch eine Überexpression des APP (*gain-of-function*-Experiment) konnte eine deutliche Steigerung der Zellproliferation beobachtet werden. Ebenfalls wurde durch konditionierten-Medien-Experimente nachgewiesen, dass sAPP $\alpha$  auch auf parakrinen Weg das Wachstum verschiedenster Zellkultursysteme stimuliert. In Übereinstimmung führte die selektive Unterdrückung der APP-Expression durch RNAi (*loss-of-function*-Experiment) zu einer signifikanten Regression des Tumorwachstums. Auch andere Arbeitsgruppen zeigten ebenfalls durch *loss-of-function*-Experimente, entweder durch Blockade der sAPP-Funktion durch Antikörper oder durch *knock-down* der Genexpression die funktionelle Beziehung zwischen dem Tumorwachstum und dem APP (Pietrzik et al., 1998; Ohsawa et al., 1999; Hansel et al., 2003; Ko et al., 2004; Takayama et al., 2009). Auch wurde in anderen Tumorentitäten, wie dem Prostata- (Takayama et al., 2009), Schilddrüsen- (Krause et al., 2008), Nebenschilddrüsen- (Haven et al., 2004), Nasopharyngeal- (Tang et al., 2010), oralem Plattenepithelkarzinom (Ko et al., 2004), im EBV-negativen-Burkitt-Lymphom (Maesako et al., 2003), in der akuten myeloischen Leukämie (Baldus et al., 2004) sowie im Melanom (Botelho et al., 2009) eine selektive APP-Überexpression im malignen Gewebe bestätigt.

Diverse pro-inflammatorische und onkogene Stimuli sind in der Lage die APP-Expression zu induzieren (Goldgaber et al., 1989; Donnelly et al., 1990). So wurde gezeigt, dass eine Aktivierung der Ras/MAPK-Signalkaskade zu einer Erhöhung der APP-Transkription führt (Villa et al., 2001). Ebenfalls konnte nachgewiesen werden, dass Wachstumsfaktoren wie NGF (*nerve growth factor*), bFGF (*basic fibroblast growth factor*), TGF- $\alpha$  (*transforming growth factor alpha*) und der EGF (*epidermal growth factor*) nicht nur die Promotoraktivität erhöhen, sondern auch die Prozessierung des APP in Richtung  $\alpha$ -Sekretase verschieben (Mobley et al., 1988; Gray & Patel, 1993; Rossner et al., 1998). Auch leisten die Bindungsstellen für Eisen und IL-1 (*interleukin-1*) am 5'-nicht-translatierten Ende (5'-UTR, *untranslated region*) der APP mRNA einen wesentlichen Beitrag zur Stabilität und Regulation der Translation (Rogers et al., 1999). In hormonabhängigen Tumoren, wie dem Schilddrüsen- und Prostatakarzinom, konnte weiterhin beobachtet werden, dass Androgene und TSH (Thyreotropin, *thyroid stimulating hormone*) selektiv die APP-Transkription erhöhen (Pietrzik et al., 1998; Villa et al., 2004; Krause et al., 2008; Takayama et al., 2009).

Besonders hervorzuheben ist die Überexpression von APP in der akuten myeloischen Leukämie (AML). *Microarray*-Analysen zeigten, dass besonders in AML-Patienten mit komplex-aberranten Karyotyp und alteriertem Chromosom 21 im Vergleich zu normalen Karyotyp eine bis zu siebenfache APP-Überexpression vorlag. Die APP-Expression korrelierte mit dem Grad der genomischen Amplifikation und war mit Abstand das am höchsten exprimierte Gen. Ebenfalls konnte auch in einer Subpopulation von AML-Patienten mit normalem Karyotyp eine signifikant gesteigerte APP-Expression nachgewiesen werden (Baldus et al., 2004). Klinisch zeichnen sich AML-Patienten mit einem komplexen Karyotyp durch eine sehr ungünstige Prognose aus (Byrd et al., 2002).

Auch die tumorassoziierte Inflammation ist in vielen Tumorentitäten mit einer schlechten Prognose behaftet (Erdman & Poutahidis, 2010). Sondag et al. (2004) postulierten, dass APP auch in der Regulation von pro-inflammatorischen Faktoren, wie der COX-2 (*cyclooxygenase 2*), involviert ist (Sondag & Combs, 2004). Eine Verbindung zwischen dem APP und pro-inflammatorischen Mediatoren konnte auch *in vivo* bestätigt werden. In der Studie von Serrano et al. (2010) wurden gleichermaßen APP-transgene-(APP/PS1-Mausmodell) und Wildtyp-Mäuse mit dem Karzinogen 20-Methylcholanthren exponiert. Im Gegensatz zu Kontroll-Tieren konnte in APP-überexprimierenden Tieren signifikant höhere Spiegel von Inflamationsmarkern und eine erhöhte Mortalität nachgewiesen werden (Serrano et al., 2010). Den Nachweis, dass APP auch als prognostischer Biomarker verwendet werden kann, zeigten zwei unabhängige Studien. Sowohl beim Plattenepithelkarzinom der Mundhöhle als auch beim Prostatakarzinom korrelierte der Grad der APP-Expression (sowohl immunhistochemisch als auch auf RNA-Ebene) mit einer signifikant schlechteren Prognose (Ko et al., 2004; Takayama et al., 2009).

Auch konnten Hinweise gefunden werden, dass APP einen wichtigen Beitrag zur Chemotherapie-Resistenz leistet. So führte der genetische APP-*knock-down* zu einer erhöhten Sensibilität gegenüber Doxorubicin, Paclitaxel und Temozolomid. Erklärt wurde diese Beobachtung, dass durch die Reduktion von APP ebenfalls das für die Chemotherapieresistenz verantwortliche p-Glykoprotein ABCB5 runterreguliert wurde (Botelho et al., 2009).

Somit verdeutlichen die erhobenen Ergebnisse, in Übereinstimmung mit der Literatur, dass APP eine bedeutende Stellung in der lokalen und systemischen Progression diverser maligner Tumoren einnimmt. Da das gezielte Ausschalten der APP-Expression unter anderem mit einer Hemmung des Tumorwachstums einhergeht, erschließt sich dieses Protein als neue Zielstruktur und Ansatzpunkt in der Therapie von malignen Tumoren.

## 4.2 Inhibition von Histondeacetylasen als Therapieansatz maligner Tumore

Das verbesserte Verständnis der zugrunde liegenden Ursachen von malignen Entartungen führte zur Entwicklung neuer innovativer Therapieansätze. Zu ihnen zählen insbesondere epigenetische Agenzien, wie Histondeacetylase-(HDAC)-Inhibitoren. In der Tat sind epigenetische Alterationen, wie die verstärkte Expression von HDAC-Enzymen, kennzeichnend für verschiedene Tumorentitäten (Bolden et al., 2006). Diese gehen mit einer pathologisch veränderten Gentranskription einher und stellen eine charakteristische Ursache für die Tumorgenese- und progression dar (Drummond et al., 2005; Liu et al., 2006).

Epigenetische Modifikationen durch HDAC-Inhibitoren verändern allerdings nicht das gesamte Transkriptom, sondern beeinflussen lediglich die Expression eines kleinen Teils aller Gene. *In-vitro*-Experimente mit verschiedenen HDAC-Inhibitoren zeigten, dass etwa 3-10% aller Gene moduliert werden (Van Lint et al., 1996; Glaser et al., 2003). Die dadurch induzierten biologischen Effekte, wie Wachstumsinhibition, Apoptose und Differenzierung sind die essentielle Grundlagen der antikarzinogenen Wirkung dieser epigenetischen Modulatoren (Müller S & Krämer, 2010). Daher repräsentieren HDAC-Inhibitoren eine viel versprechende Gruppe neuer Tumorthapeutika.

In dieser Dissertation konnte gezeigt werden, dass der HDAC-Inhibitor Valproat (VPA) als auch andere potente HDAC-Inhibitoren über einen post-translationalen Mechanismus, spezifisch in den APP-Metabolismus eingreifen. Durch diesen neuen Ansatz ergibt sich ein verbessertes Verständnis für die komplexen Wirkmechanismen der HDAC-Inhibitoren, die zu einer potenten Wachstumsinhibition führen.

### 4.2.1 Modulation des APP-Metabolismus durch Histondeacetylase-Inhibitoren

Eine Reihe von Studien zeigte, dass VPA effektiv das Wachstum diverser maligner transformierter Zellen *in vitro* und *in vivo* inhibieren kann (Henry, 2003; Erhuma et al., 2007). Die breite Anzahl der biologischen Effekte von VPA wird durch diverse molekulare Mechanismen vermittelt. Verschiedene zelluläre Strukturen, wie zum Beispiel ERKs (*extracellular signal regulated kinase*), PPAR $\delta/\gamma$  (*peroxisome proliferator activated receptor delta/gamma*), PKC und GSK-3 $\beta$  (*glycogen synthase kinase 3 beta*) werden durch VPA moduliert (Blaheta et al., 2005). Aktuelle Studien konnten belegen, dass der zugrunde

liegende Hauptmechanismus der anti-tumoralen Wirkung von VPA durch die Inhibition von HDAC vermittelt wird (Gottlicher et al., 2001; Phiel et al., 2001).

Um nachzuweisen, dass die beobachteten Effekte auf die HDAC-inhibitorischen Eigenschaften des VPA zurückzuführen sind, wurden auf pharmakologischer Ebene Positiv- und Negativexperimente durchgeführt. Als Negativkontrolle wurde das Valpromid (VPM) verwendet. Bei diesem Analogon ist die Carboxygruppe der Valproinsäure durch eine Amidgruppe substituiert. Bereits Phiel et al. (2001) zeigten, dass VPM *in vitro* keine HDAC-inhibitorischen Eigenschaften besitzt (Phiel et al., 2001). Interessanterweise werden sowohl VPA als auch VPM in der Humanmedizin als Antikonvulsivum eingesetzt, wobei das VPM eine zwei- bis fünffach höhere Wirksamkeit zeigt (Bialer, 1991; Radatz et al., 1998). Als Positivkontrolle wurden hier sowohl das Salz der kurzkettige Fettsäure Natriumbutyrat (NaB), als auch die nicht-strukturverwandte Hydroxamsäure Trichostatin A (TSA) verwendet. VPA hemmt bevorzugt Klasse-I-HDAC-Isoenzyme (HDAC1, 2, 3), während das NaB Klasse-I- und IIa-HDAC-Enzyme hemmt (HDAC4, 5, 7, 9). Beide Inhibitoren haben ein Wirkspektrum im mM-Bereich (1-5 mM) (Chen JS et al., 2003; Sayan et al., 2010). Im Gegensatz hierzu ist der Pan-HDAC-Inhibitor TSA in der Lage im nanomolaren Wirkungsbereich alle HDAC-Klassen zu inhibieren (Breitspektrum-HDAC-Inhibitor) (Khan et al., 2008). In der zweiten Studie wurde zusätzlich das Apicidin, ein zyklische Peptid-Antibiotikum, als weiterer potenter HDAC-Inhibitor eingesetzt. Apicidin hemmt präferentiell Klasse-I-HDAC-Enzyme im nanomolaren Bereich. Im Gegensatz zu den anderen eingesetzten HDAC-Inhibitoren ist Apicidin ein irreversibler HDAC-Inhibitor (Han et al., 2000). Die Proliferationsanalysen bestätigten, dass HDAC-Inhibitoren in der Lage waren, das Wachstum von Pankreas- und Kolonkarzinomen zu reduzieren. Es stellte sich heraus, dass durch den Einfluss von VPA sowohl das Gesamt-APP als auch das sekretierte  $\alpha$ -Sekretase Produkt sAPP $\alpha$  reduziert wurde. Durch die zusätzliche Validierung der Ergebnisse in mehreren Zelllinien konnte bestätigt werden, dass es sich hierbei um einen generellen und nicht um einen zelltypischen Effekt handelte. In weiterführenden Experimenten zur detaillierteren Analyse des Effekts konnte gezeigt werden, dass VPA spezifisch APP-Spiegel reduzierte, ohne wesentliche Effekte auf das homologe Familienmitglied APLP2 oder den EGFR auszuüben. Durch die Verwendung weiterer HDAC-Inhibitoren und der Negativkontrolle VPM, konnte bestätigt werden, dass die spezifische Modulation des APP-Metabolismus auf einem HDAC-abhängigen Mechanismus beruht. Durch den Nachweis an hyperacetylierten Histonen (H4Ac) konnte die effektive HDAC-Inhibition bestätigt werden. Eine Behandlung mit VPM führte zu keiner Änderung der H4Ac-Spiegel und zeigte ebenfalls keine Effekte auf die APP-

Expression. Trotz der HDAC-Abhängigkeit konnte unter einer VPA-Behandlung keine Veränderung der APP-Transkription festgestellt werden. Dieses Ergebnis ist konsistent mit Resultaten einer aktuellen Studie in der die Behandlung von N2a-Zellen (murine Neuroblastoma-Linie) mit VPA keine Alteration der Genexpression von APP, PS1 (*presenilin 1*) oder BACE1 (*beta-site-APP-cleaving enzyme*) auslöste (Qing et al., 2008).

Vielmehr konnte nachgewiesen werden, dass durch VPA die Reifungseffizienz des APP vermindert wurde, was auf einen post-translationalen Mechanismus hindeutete. Aus der verringerten APP-Reifung, resultieren geringere Substratspiegel für die Sekretasen und somit eine reduzierte Prozessierung. Dies führte zu der beobachteten proportionalen Abnahme des extrazellulären Spaltprodukts sAPP $\alpha$ . Zusammen mit dem Ergebnis, dass auch das GesamtsAPP (sAPP $\alpha$  und sAPP $\beta$ ) konzentrationsabhängig reduziert wurde konnte indirekt ausgeschlossen werden, dass VPA zusätzlich die Aktivität von  $\alpha$ - und  $\beta$ -Sekretasen beeinflusste.

#### **4.2.2 Modell für den Wirkmechanismus von VPA auf den APP-Metabolismus**

Um den genauen Mechanismus der spezifischen Modulation des APP-Metabolismus zu klären, wurde in den folgenden Experimenten die Relevanz des APP-Interaktionsprotein GRP78/BiP (78-kilodalton-*glucose-regulated-protein* oder *binding immunoglobulin protein*) untersucht. Dieses *Heat-Shock-Protein* ist im endoplasmatischen Retikulum (ER) lokalisiert und ist nicht nur am Reifungsprozess, sondern auch essentiell an der Degradation verschiedenster Proteine (wie dem Apolipoprotein B, LDL-Rezeptor und dem APP) beteiligt (Yang et al., 1998; Jorgensen et al., 2000; Zhang & Herscovitz, 2003).

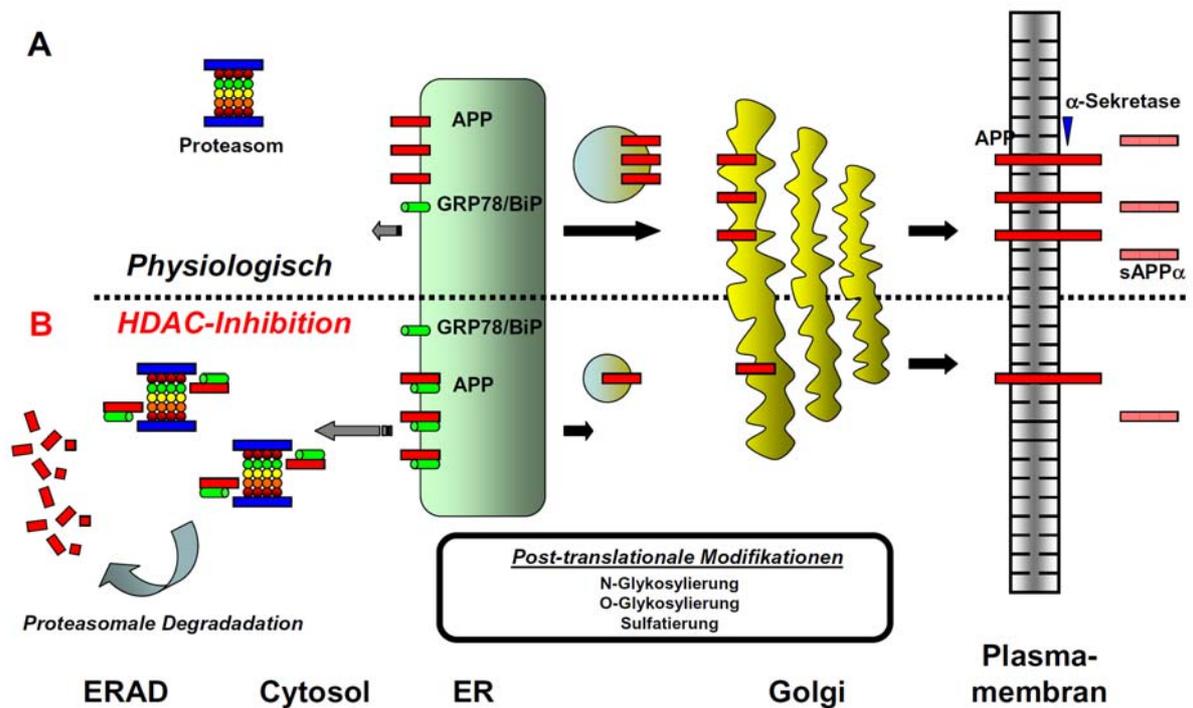
In dieser Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass eine HDAC-Inhibition zu einer signifikanten Induktion der GRP78-Expression führte. Diese konnte sowohl auf mRNA- als auch auf Proteinebene bestätigt werden. Hingegen führte eine Behandlung mit VPM zu keiner Alteration der GRP78-Spiegel. Bereits 1999, vor der Entdeckung, dass VPA ein potenter HDAC-Inhibitor ist, untersuchten Wang JF et al. (1999) die Modulation der mRNA-Expression im Rattenkortex nach einer dreiwöchigen VPA-Behandlung. Dabei konnten sie eindrucksvoll zeigen, dass VPA selektiv in die Gen-Regulation des GRP78 eingreift. Eine weitere Versuchsreihe *in vitro* konnte präzisieren, dass der beobachtete Effekt zeitabhängig ebenso in kultivierten C6-Gliomzellen auftrat und keine Alteration des homologen HSP70 (*heat shock protein 70*) auslöste (Wang JF et al., 1999). In einer aktuellen Studie konnte eine

HDAC1-spezifische Bindungsstelle auf dem GRP78-Promotor identifiziert werden. Durch ChIP-Analysen (Chromatin-Immunopräzipitation) vor und nach TSA-Stimulation konnte bestätigt werden, dass durch die Inhibition von HDAC selektiv die Expression des GRP78 induziert wird (Baumeister et al., 2009).

Das GRP78 spielt im Gegensatz zu anderen ER-Chaperonen eine wesentliche Rolle im APP-Metabolismus. Dieses molekulare Chaperon bindet selektiv das APP im ER und verhindert dessen korrekte Maturation, subzellulären Transport und dementsprechend seine Sekretion. Eine Überexpression von GRP78 führt dementsprechend zu einer Beeinträchtigung der APP-Reifung und Sekretion. Durch Ko-Immunopräzipitations-Experimente konnte gezeigt werden, dass GRP78 selektiv die unreife APP-Form bindet (Yang et al., 1998). *Pulse-Chase*-Experimente validierten, dass eine Überexpression von GRP78 zu einer Inhibition der APP-Maturation führt (Hoshino et al., 2007). Dadurch kommt die Vermutung in Betracht, dass durch die GRP78-APP-Interaktion, die Translokation des APP vom ER zum *cis*-Golgi-Netzwerk unterbunden wird. Die Konsequenz dieser Bindung im ER resultiert in einer inkompletten post-translationalen Modifikation (N und -O-Glykosylierung, Sulfatierung) des APP (Weidemann et al., 1989; Suzuki et al., 1994). Insbesondere die O-Glykosylierung die im Golgi-Netzwerk stattfindet, dient als wichtiges Signal für eine effektive Transportierung zur Plasmamembran, wo die Prozessierung durch die Sekretasen stattfindet (Tomita et al., 1998). Eine weitere Folge der inkompletten Glykosylierung ist die Retrotranslokation des unreifen APP aus dem ER ins Cytosol, wo es über den proteasomalen Weg abgebaut wird (ERAD, *ER-associated degradation*) (Bunnell et al., 1998; Chen Q et al., 2002; Huttunen et al., 2007). So konnte bereits für das Apolipoprotein B100 (ApoB100), einem weiteren GRP78-Interaktionsprotein, nachgewiesen werden, dass eine Hochregulation von GRP78 zu einer vermehrten proteosomalen Degradation des ApoB100 führt und durch eine parallele Proteasom-Inhibition revertiert werden kann (Qiu et al., 2005). Wie genau das GRP78 an der Retrotranslokation beteiligt ist und ob eine Ubiquitin-abhängige oder -unabhängige proteosomale Degradation des APP stattfindet, konnte in dieser Dissertation nicht endgültig geklärt werden. Interessanterweise konnte durch eine quantitative Interaktom-Analyse nachgewiesen werden, dass GRP78 hochspezifisch an das APP bindet und nicht mit den homologen Familienmitgliedern APLP1 (*amyloid precursor-like protein 1*) oder APLP2 (*amyloid precursor-like protein 2*) interagiert (Bai et al., 2008). Die pharmakologische Induktion des GRP78 stellt somit die mechanistische Grundlage dar, wie HDAC-Inhibitoren spezifisch in den APP-Metabolismus eingreifen.

Zusammengefasst konnte in dieser Doktorarbeit gezeigt werden, dass HDAC-Inhibitoren mittels des molekularen Chaperons GRP78 spezifisch die Reifungseffizienz und Sekretion des APP reduzieren. Die selektive Unterdrückung der APP-Sekretion bietet einen neuen Erklärungsansatz für die noch unvollständig verstandene anti-neoplastische Wirkung von HDAC-Inhibitoren.

Die Abbildung 4.1 zeigt eine schematische Darstellung des postulierten Wirkmechanismus von HDAC-Inhibitoren auf den APP-Metabolismus.



**Abb. 4.1: Schematische Darstellung des postulierten Mechanismus.** (A) In unbehandelten Zellen wird das APP ins ER transloziert und N-glykosyliert. Nach der Translokation ins cis-Golgi-Netzwerk erfolgt die komplette Reifung, wenn das APP O-glykosyliert und tyrosyl-sulfatiert wird. Anschließend wird das APP durch Golgi-Vesikel zur Zellmembran transportiert, wo u.a. eine Prozessierung durch die  $\alpha$ -Sekretase erfolgt. (B) Die Behandlung mit HDAC-Inhibitoren führt zu einer Induktion der GRP78/BiP-Genexpression. Die Überrepräsentation dieses molekularen Chaperons führt zu einer vermehrten Bindung der unreifen APP-Form und verhindert dadurch dessen korrekte Reifung. Ein weiterer Transport zur Plasmamembran wird hierdurch unterbunden. Das unterglykosylierte APP wird in das Zytosol geschleust und über den ERAD-Abbauweg proteasomal degradiert.

### 4.3 Die biologische Relevanz des APP in transformierten, pluripotenten Stammzellen

Ein weiterer Aspekt dieser Dissertation war auch die Charakterisierung der APP-Expression in pluripotenten, transformierten Stammzellen. Dabei wurden gezielt die testikulären

Keimzelltumore untersucht. Im Gegensatz zu anderen malignen Tumoren ist diese Tumorentität seit der Einführung der Cisplatin beinhaltenden Chemotherapie auch in fortgeschrittenen, metastasierten Stadien heilbar (Einhorn & Donohue, 1977). Das interessante am Studium der Keimzelltumore sind die dualen Möglichkeiten, sowohl tumorbiologische als auch stammzell- und entwicklungsbiologische Aspekte zu untersuchen. Dies ist dadurch bedingt, dass diese Tumore aus einer malignen entarteten Keimzelle entstehen und dadurch noch Eigenschaften pluripotenter Stammzellen tragen (Andrews et al., 2005; Horwich et al., 2006).

Die immunhistochemische Analyse des APP in testikulären Tumoren zeigte eine starke Expression in pluripotenten Seminomen und embryonalen Karzinomen. Ausdifferenzierte Formen, wie Dottersacktumore, Chorionkarzinome und Teratome, zeigten nur niedrige oder fokale APP-Expressionen. Interessanterweise zeigte die immunhistochemische Expressionsanalyse des homologen APP-Familienmitgliedes APLP2 ein anderes Bild. Sowohl in undifferenzierten als auch in differenzierten Keimzelltumor-Subtypen konnte durchgehend eine APLP2-Expression nachgewiesen werden, wodurch vermutet werden kann, dass dieses Protein im spontanen Tumordifferenzierungsprozess nur eine untergeordnete Rolle spielt. Konsistent zu der Expression des APP konnten auch in undifferenzierten Seminomen und embryonalen Karzinomen hohe Spiegel der Pluripotenzmarker Oct-3/4 und NANOG nachgewiesen werden, während in differenzierten Tumorkohorten deutlich niedrigere Expressionen zu detektieren waren. In Übereinstimmung mit der Biologie der Seminome, konnte in diesem Tumor-Subtyp keine Expression von Sox2 nachgewiesen werden, während embryonale Karzinome hohe Spiegel aufwiesen (de Jong et al., 2008). Stammzellgene, wie NANOG, Oct-3/4 und Sox2 bilden ein regulatorisches Netzwerk, das die Pluripotenz und die Selbsterneuerung in embryonalen Stammzellen und transformierten, pluripotenten Zellen erhält. Durch die starke und selektive Koexpression mit der Stammzellsignatur (Sox2, Oct-3/4 und NANOG) konnte erstmalig das APP als verlässlicher molekularer Marker von undifferenzierten Keimzelltumor-Subtypen identifiziert werden. Konsistent zu der Überexpression des APP in transformierten Stammzellen, konnten auch in humanen embryonalen Stammzellen hohe APP-Proteinspiegel nachgewiesen werden. Im Vergleich zu M17-Neuroblastoma-Zellen zeigten H9-Zellen (humane pluripotente embryonale Stammzellen) eine zwei- bis vierfache APP-Überexpression. In beiden Zelllinien konnte eine ähnlich starke Expression des  $\beta$ hCG/LH (*beta-human chorionic gonadotropin/luteinizing hormone*)-Rezeptors nachgewiesen werden. Aber nur in H9-Zellen führte eine Behandlung mit hCG zu einer Hochregulation von APP-Spiegeln. In differenzierten M17-

Zellen konnte keine Induktion ausgelöst werden (Bowen et al., 2004; Porayette et al., 2007). Diese Tatsache ist besonders interessant, da aus embryonaler Sicht, das hCG nicht nur in der Schwangerschaftserhaltung, sondern möglicherweise auch für die embryomaternalen Kommunikation eine Schlüsselrolle spielt (Licht et al., 2002).

Bedingt durch die Ähnlichkeit zwischen malignen pluripotenten Karzinomzellen und humanen embryonalen Stammzellen, führt sowohl die Implantation von embryonalen Stammzellen, als auch von embryonalen Karzinom-Zelllinien zu einer spontanen Ausbildung von Teratomen (Przyborski, 2005). Diese Tumore sind aus Abkömmlingen aller drei Keimblätter (tridermale Differenzierung) zusammengesetzt. Ein wichtiges Unterscheidungsmerkmal zwischen embryonalen Stammzellen und embryonalen Karzinomzellen ist, dass erstere ausschließlich benigne Teratome bilden, während letztere Teratokarzinome induzieren. Diese sind zusammengesetzt aus hochdifferenzierten Strukturen und undifferenzierten malignen Anteilen.

In dieser Arbeit wurden embryonale NTera-2-Tumorzellen in Nacktmäuse implantiert. Durch die Etablierung und Charakterisierung dieses Xenograft-Modells konnten zwei Hauptaussagen getroffen werden. Zum einen führte die *in-vivo*-Injektion von undifferenzierten NTera-2-Zellen in Nacktmäusen zu einer spontanen Formation von Teratokarzinomen. Zum anderen präsentierten die immunhistochemischen Analysen der APP-Expression eine starke Färbung in pluripotenten, undifferenzierten Anteilen, wohingegen in hoch-differenzierten somatischen Strukturen signifikant niedrigere oder keine APP-Expressionen festgestellt werden konnte. Damit konnten die immunhistochemischen Untersuchungsergebnisse der testikulären Keimzelltumoren im Xenograft-Modell reproduziert werden.

Bereits Andrews et al. (1984) zeigten, dass die *in-vivo*-Implantation von NTera-2-Zellen zu funktionellen, phänotypischen und heterogenen Differenzierungsstadien aller drei Keimblattformen (ektodermal, entodermal und mesodermal) führt. Übereinstimmend mit eigenen Untersuchungen konnten prädominante, epitheliale, glanduläre sowie unreife Knorpel- und Muskelstrukturen nachgewiesen werden. Nur ein kleiner Teil der Teratome zeigte Anzeichen einer neuronalen Differenzierung in Form von neuronalen Rosetten oder Neuralrohr-ähnlichen Formationen auf (Andrews et al., 1984). Das Potential und die Richtung der Differenzierung von pluripotenten embryonalen Karzinomzellen sind abhängig von der Differenzierungspotenz und vom zellulären Mikromilieu. So führte die Implantation von NTera-2-Zellen in Gehirne von neugeborenen Mäusen zu keiner Tumorbildung, sondern zu funktionierenden Oligodendrozyten und Nervenzellen (Ferrari et al., 2000). Dies verdeutlicht

die essentielle Bedeutung von endogenen als auch exogenen Faktoren und Signalen die zu einer Modulation der Linien-spezifischen Differenzierung führen. Die exakten zugrunde liegenden Mechanismen sind aber bisher weitestgehend unverstanden.

Dass APP selbst an der Modulation der Differenzierungsplastizität von Stammzellen beteiligt ist, konnte durch Kwak et al. (2006) gezeigt werden. Sowohl eine Behandlung mit sAPP $\alpha$ , als auch die Überexpression von APP in humanen neuronalen Stammzellen führte zu einer glialen Differenzierung. Weiterhin konnten die Autoren zeigen, dass die Aktivierung des IL-6/gp130-Signalwegs hierbei eine zentrale Rolle spielt (Kwak et al., 2006; Kwak et al., 2010). Ebenfalls konnte in Differenzierungsstudien mit neuronalen Stammzellen von Trisomie-21-Patienten (mit einer erhöhten APP-Genosis), vermehrt Gliazellen nachgewiesen werden. Marutle et al. (2007) implantierten neuronale Stammzellen in (vier bis sieben Monate alte) transgene APP23-Mäuse und zeigten, dass die pharmakologische Reduktion von APP-Spiegeln durch (+)-Phenserin zu einer vermehrten neuronalen Spezifizierung führte (Marutle et al., 2007). Weiterhin konnte in APP<sub>wt</sub>-Mäusen eine verminderte hippocampale Neurogenese nachgewiesen werden. Im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen zeigten APP-überexprimierende Mäuse (APP<sub>wt</sub>) dafür aber eine deutliche Erhöhung von undifferenzierten Stammzellen (die weder neuronale noch gliale Marker exprimieren) im Hippocampus (Naumann et al., 2010). Dies verdeutlicht einmal mehr, dass neben der trophischen Wirkung auch andere Funktionen, wie die Förderung von Zell-Zell-Interaktionen und der Zelladhäsion durch APP ausgelöst werden (Wang Y & Ha, 2004; Soba et al., 2005). Insbesondere Zell-Zell-Interaktionen spielen eine wesentliche Rolle für den Erhalt des Differenzierungspotentials und die Aufrechterhaltung eines undifferenzierten und selbsterneuernden Zustand von Stammzellen (Andrews, 1998).

In Übereinstimmung mit der Literatur zeigen die erhobenen Daten, dass APP nicht nur als Marker für pluripotente, transformierte Zellen fungiert, sondern auch einen essentiellen Beitrag zur Aufrechterhaltung des Stammzellcharakters leistet.

### **4.3.1 Histondeacetylase-Inhibitoren als potente Induktoren der Differenzierung**

Die epigenetische Modulation der HDAC ist mit einer Konformationsänderung des Chromatins verbunden. Die damit verbundenen Veränderungen der Genexpressionen führen zu einer Vielzahl biologischer Effekte. Frühe Arbeiten zeigten, dass eine Hemmung der HDAC-Enzyme mit einem Proliferationsstopp und einer Differenzierungsinduktion in

transformierten Zellen einhergehen (Marks et al., 2000). Diese Beobachtungen führten zur Entwicklung eines anti-tumoralen Behandlungskonzeptes, das auf der Annahme basiert, dass Tumorzellen unreifen Progenitorzellen (Vorläuferzellen) entsprechen und dementsprechend noch die Fähigkeit zur terminalen Differenzierung besitzen (Blaheta & Cinatl, 2002; Drummond et al., 2005).

Mittels einer *Microarray*- und RT-PCR-Analysen konnten tiefere Einblicke in die Wirkungsweise von HDAC-Inhibitoren gewonnen werden. Eine Behandlung mit VPA resultierte in einer signifikanten Modulation des Genexpressionsprofils von embryonalen Karzinomzellen. Dabei konnte auf transkriptioneller Ebene sowohl eine Suppression von Pluripotenzgenen, als auch die Induktion von linienspezifischen Differenzierungsmarkern nachgewiesen werden. Anschließende Western-Blot-Analysen zeigten, dass auch auf Proteinebene Pluripotenz- und Differenzierungsgene moduliert wurden. Gestützt wurden diese Beobachtungen auch durch den phänotypischen Nachweis einer Differenzierung nach einer Behandlung mit VPA oder Apicidin. Entsprechend des postulierten Mechanismus konnte ebenfalls die GRP78-vermittelte Suppression des APP bestätigt werden. Damit konnte erneut ein kongruentes Muster zwischen der Stammzellsignatur und APP beobachtet werden. Konsistent zu den immunhistochemisch erhobenen Daten, konnten sowohl in der spontanen *in-vivo*-Differenzierung, als auch durch eine pharmakologische Differenzierungsinduktion mittels HDAC-Inhibitoren ein gleichzeitiger Verlust von Pluripotenzmarkern und APP nachgewiesen werden. Hierbei muss unterschieden werden, dass die Stammzellgene und das APP auf verschiedenen Ebenen durch HDAC-Inhibitoren reguliert werden. Pluripotenzgene werden in erster Linie auf transkriptioneller Ebene herunterreguliert. Insbesondere der Transkriptionsfaktor NANOG scheint in embryonalen Karzinomen eine zentrale Schlüsselrolle in der Regulation von Oct-3/4 und Sox2 zu spielen. So konnte gezeigt werden, dass sowohl durch Apicidin als auch durch ein siRNA-vermittelter *knock-down* von NANOG in einer verminderten Genexpression von Sox2 und Oct-3/4 resultierte. Eine transiente Überexpression von NANOG konnte eine Revertierung der Stammzellgenexpression induzieren (You et al., 2009). Wie zuvor erklärt, wird das APP post-translational über das GRP78 supprimiert. Ähnlich wie in Kolonkarzinomzellen führte eine VPA-Behandlung zu keiner Alteration der APP-Transkription. Im Gegensatz zu vorherigen Resultaten, konnte in NTERA-2-Zellen auf RNA-Ebene nach 24 h kein signifikanter Unterschied in der GRP78-Expression festgestellt werden. Die Messung über verschiedene Zeitpunkte hinweg zeigte, dass die Genexpression des GRP78 nur transient reguliert wurde. Auf Proteinebene konnte aber dennoch eine deutliche GRP78-Induktion beobachtet werden. Die Diskrepanz zwischen

der mRNA und dem Proteinspiegel vom GRP78 lassen sich durch die lange Halbwertszeit des Proteins (> 24h) erklären (Sato et al., 1993).

Dass die Stammzellsignatur auch *in vivo* auf transkriptioneller Ebene runterreguliert wird zeigten Korkola et al (2005). Die Autoren verglichen Genexpressionprofile zwischen undifferenzierten und differenzierten Keimzelltumor-Subtypen und stellten eine signifikant reduzierte NANOG- und Oct-3/4-Genexpression in Dottersacktumoren, Chorionkarzinom und Teratomen fest (Korkola et al., 2005). Konsistent mit Skotheim et al. (2005), konnte in beiden Studien aber keine differentielle Regulation der APP-Genexpression zwischen pluripotenten und hoch-differenzierten Subtypen festgestellt werden (Skotheim et al., 2005). Hinweise, dass auch *in vivo* der APP-Metabolismus post-translational moduliert wird, lieferte die immunhistochemische Charakterisierung des GRP78 in testikulären Keimzelltumoren. Hier konnte eine inverse Korrelation zwischen der APP und der GRP78-Expression festgestellt werden. Im Gegensatz zu undifferenzierten Seminomen und embryonalen Karzinomen, konnten signifikant erhöhte GRP78-Spiegel in differenzierten Subtypen nachgewiesen werden. In mehreren unabhängigen Studien konnte der Nachweis erbracht werden, dass GRP78 nicht nur für die Qualitätskontrolle von Proteinen zuständig ist, sondern ebenfalls in regulatorischen Abläufen und im physiologischen Zelldifferenzierungsprozess beteiligt ist (Wu & Kaufman, 2006). So konnte eine deutliche Hochregulation von GRP78 während der Myogenese (Nakanishi et al., 2005), der Spermatogenese (Huo et al., 2004; Lachance et al., 2010), in der Plasmazell- (Wiest et al., 1990) und Epitheldifferenzierung (Sugiura et al., 2009) festgestellt werden.

Die Stellung des GRP78 in der Tumorprogression wird derzeit kritisch diskutiert und ist noch nicht vollständig aufgeklärt. In mehreren Studien konnte nachgewiesen werden, dass Tumorgewebe höhere GRP78-Spiegel aufweisen als umliegende gesunde Zellen (Lee AS, 2007). Doch konnte in aktuellen Untersuchungen beobachtet werden, dass ebenfalls wie in der physiologischen Differenzierung, GRP78-Expressionen in undifferenzierten malignen Zellen signifikant niedriger sind als in hoch-differenzierten Tumorgewebe. Dies konnte bereits für das Neuroblastom, orale Plattenepithelkarzinom, Ösophaguskarzinom, Blasenkarzinom und im Lungenkarzinom gezeigt werden (Hsu WM et al., 2005; Uramoto et al., 2005; Langer et al., 2008; Huang TT et al., 2010; Uematsu et al., 2010). Auch zeigten zwei Studien, dass eine hohe GRP78-Expression im Lungen- und Blasenkarzinom mit einer verbesserten Prognose und einer erniedrigten Mortalität zusammenhängt (Uramoto et al, 2005; Uematsu et al, 2010).

Zusammengefasst konnten die Ergebnisse bezüglich der HDAC-abhängigen Modulation des APP-Metabolismus in embryonalen Karzinomen reproduziert werden. Ebenfalls konnte durch die epigenetische Modulation ein gemeinsames Muster zwischen der Stammzellsignatur und dem APP beobachtet werden. Weiterhin konnte eine inverse Korrelation zwischen der GRP78- und der APP-Expression in testikulären Keimzelltumoren festgestellt werden. Damit kann angenommen werden, dass ähnlich wie durch HDAC-Inhibitoren, die Induktion von GRP78 während des Differenzierungsprozesses *in vivo* zu einer Reduktion der APP-Spiegel führt. Das bedeutet, je differenzierter die Tumorentität ist, desto höher die GRP78-Spiegel und umso geringer die APP-Expression.

### 4.3.2 Revertierung der Differenzierung durch sekretiertes sAPP

In verschiedenen Studien konnte beobachtet werden, dass eine Differenzierungsinduktion mit dem Verlust von Tumorigenität, Pluripotenz und der transkriptionellen Suppression von diversen Wachstumsfaktoren einhergeht. Im Hinblick auf das embryonale Karzinom ist dies für TGF- $\alpha$  (*transforming growth factor alpha*), TDFG-1 (*teratocarcinoma derived growth factor 1*) und FGF4 (*fibroblast growth factor 4*) beschrieben worden. Die exogene Addition dieser genannten Wachstumsfaktoren konnten zwar die Wachstumsinhibition von potenten Differenzierungsinduktoren (wie Retinolsäure oder Hexamethylenbisacetamid) antagonisieren, nicht aber eine Induktion von Differenzierungsgenen verhindern (Baselga et al., 1993; Baldassarre et al., 1997; Maerz et al., 1998).

Zuvor konnte in Kolonkarzinomzellen gezeigt werden, dass sAPP $\alpha$  aus konditioniertem Medium von APP-überexprimierenden Zellen, eine HDAC-induzierte Wachstumsinhibition komplett revertieren konnte. In NTera-2-Zellen konnte durch eine parallele Behandlung mit sAPP $\alpha$  komplett die Induktion des entodermalen Markers AFP (*alpha-fetoprotein*) (Guan et al., 2006; Sidhu et al., 2008), als auch partiell die Induktion des ektodermalen Markers Pan-CK (*pan-cytokeratin*) (Li H et al., 2009) durch Apicidin verhindert werden. Im Vergleich zur Kontrolle (Mock-Medium) konnten keine deutlichen Unterschiede in H4Ac- oder APP-Spiegeln nachgewiesen werden. Dadurch konnte schlussgefolgert werden, dass durch die Addition von konditionierten Medien (sAPP $\alpha$  oder Mock-Medium) keine Aktivitätsminderung der HDAC-Inhibition ausgelöst wurde. Durch diese Ergebnisse lässt sich ableiten, dass Signalkaskaden die eine HDAC-induzierte Differenzierung auslösen, direkt durch sAPP $\alpha$  abgeschwächt werden oder das parallel durch sAPP $\alpha$ -induzierte Faktoren mit

differenzierungsinduzierten Kaskaden interferieren. In einer aktuellen Studie konnte durch ein ähnliches Experiment nachgewiesen werden, dass eine Apoptose-Induktion durch Epoxomicin durch eine gleichzeitige Behandlung mit sAPP $\alpha$ , sowohl die Induktion von Caspasen als auch die stress-aktivierte-JNK-(*c-jun-N-terminal kinase*)-Signalkaskade inhibiert wird (Copanaki et al., 2010). Wie, und vor allem welche durch HDAC-abhängige Signaltransduktionen durch sAPP $\alpha$  moduliert werden, ist in dieser Arbeit nicht eruiert worden und noch Gegenstand aktueller Forschung.

### **4.3.3 Histondeacetylase-Inhibitoren reduzieren APP *in vivo***

Substanzen die den epigenetischen Status von Tumoren modulieren stellen einen viel versprechenden Ansatz in der Krebstherapie dar. Bereits in vorangegangenen Studien konnte der Nachweis erbracht werden, dass eine Behandlung mit VPA in tierexperimentellen Studien mit Tumorzellen der Prostata (Xia et al., 2006), Gebärmutter (Takai et al., 2004a), Ovarien (Takai et al., 2004b), Medullublastom (Li XN et al., 2005), Blase (Chen CL et al., 2006) und der Niere (Jones et al., 2009) effektiv das Tumolvolumen reduziert wurde. In einer aktuellen Studie konnte gezeigt werden, dass eine chronische Behandlung mit VPA und dem DNA-Methyltransferase-Inhibitor 5-aza-2'-deoxycytidine im *Ptch*-(*Patched*)-Mausmodell nicht nur das Tumorwachstum verringert wird, sondern auch zu einer signifikant verlängerten tumorfreien Überlebenszeit führt (Ecke et al., 2009). Basierend auf diesen Arbeiten wurde ein Xenograft-Modell für das embryonale Karzinom etabliert. Beruhend auf eigenen *in-vitro*-Daten, wurde hierfür die NTera-2-Zelllinie verwendet, da diese am sensitivsten gegenüber VPA reagierte. Im Tiermodell wurden zwei Behandlungsmodalitäten untersucht. Die chronisch-prophylaktische Gabe erfolgte in symptomfreien Tieren, vier Tage nach Tumorinokulation. Um nachzuweisen, ob VPA auch einen Einfluss auf die Tumorprogression hat, wurden Tiere erst nach Ausbildung von klinisch manifesten und makroskopisch sichtbaren Tumoren mit VPA behandelt (therapeutische Behandlung). In beiden Behandlungsmodalitäten wurde das VPA oral durch das Trinkwasser appliziert. Sowohl die chronisch-prophylaktische als auch die therapeutische Behandlung mit VPA führte zu einer signifikanten Inhibition des Tumolvolumens gegenüber unbehandelten Kontrollen. In Übereinstimmung mit früheren Studien konnte besonderes bei chronisch-prophylaktischer Verabreichung ein starker Effekt auf das Wachstum bzw. eine Hemmung der Tumorinduktion festgestellt werden (Xia et al., 2006). Im Vergleich zu anderen *in-vivo*-Tumormodellen konnte

festgestellt werden, dass VPA äußerst potent das Tumorstadium von humanen embryonalen Karzinomen inhibierte. Eine mögliche Erklärung für diese Beobachtung ist, dass Keimzelltumoren nicht nur gegenüber epigenetischen Modulatoren, sondern auch gegen DNA-zerstörende Substanzen, wie Cisplatin oder einer Bestrahlung äußerst sensitiv reagieren. Es wird vermutet, dass die Ursache der embryonale Ursprung der Keimzelltumore ist. Ähnlich wie embryonale Stammzellen, zeigen embryonale Karzinome eine hohe Aktivität von DNA-Schutzmechanismen. Daher kann in diesen Tumoren unter anderem nur eine niedrige Mutationsfrequenz in Tumorsuppressorgenen festgestellt werden (Greenman et al., 2007). Im Gegensatz zu den meisten soliden Tumorentitäten, kommen Mutationen im p53-Gen bei Keimzelltumoren kaum vor (Heidenreich et al., 1998).

Eine gleichwertig wichtige Beobachtung war, dass die durch VPA bedingte verminderte Volumenabnahme mit einer deutlichen Reduktion der APP-Expression einherging. Konsistent zu vorangegangenen *in-vitro*-Ergebnissen, unterschieden sich die APP-Spiegel nicht zwischen beiden Behandlungsmodalitäten. Dadurch konnte erstmalig gezeigt werden, dass physiologisch-therapeutische VPA-Dosen in der Lage sind, die endogene APP-Expression auf ein basal-niedriges Niveau zu reduzieren. Durch eine prolongierte VPA-Gabe wurden diese niedrigen Spiegel konstant stabilisiert. In einer aktuellen Studie konnte der Nachweis erbracht werden, dass APP auch *in vivo* als relevanter Wachstumsfaktor in malignen Tumoren fungiert. In einem Prostata-Xenograft-Modell führte eine Behandlung mit siRNA-Oligonukleotiden gegen das APP zu einer zeitabhängigen Reduktion des Tumorstadiums. Bereits nach zweiwöchiger Behandlung konnte ein signifikanter Effekt auf das Tumorstadium beobachtet werden (Takayama et al., 2009). Daher ist anzunehmen, dass trotz der Vielfalt an HDAC-modulierten Faktoren (wie Bax, Cyclin D3, Rb, Cdk1, p21), die Senkung der APP-Expression ein wichtiger Bestandteil der wachstumshemmenden Eigenschaften von HDAC-Inhibitoren darstellt (Jones et al., 2009).

#### **4.3.4 Schlussfolgerungen**

In der vorliegenden Arbeit konnte auf verschiedenen Ebenen bestätigt werden, dass APP eine wichtige Stellung als Wachstumsfaktor einnimmt. Die molekularen Mechanismen der proliferativen Wirkung von sAPP $\alpha$  sind bislang aber weitgehend ungeklärt. Insbesondere könnten in weiterführenden Versuchen die Rezeptoren und genauen Signaltransduktionswege charakterisiert werden. Dadurch würde ein verbessertes Verständnis für die biologische APP-Funktion gewonnen werden. Weiterhin könnte durch diese Experimente die Rolle und

Stellung des APP, als auch die Wechselwirkung mit anderen Wachstumsfaktoren und Signalkaskaden charakterisiert werden.

Durch immunhistochemische Analysen in verschiedensten Tumorentitäten, konnte eine selektive Überexpression des APP nachgewiesen werden. Im Zusammenhang mit der Literatur, konnte bereits in zwei Studien gezeigt werden, das APP nicht nur als immunhistochemischer Marker für Tumoren, sondern auch als prognostischer Biomarker verwendet werden kann (Ko et al., 2004; Takayama et al., 2009). Zusammen mit eigenen Ergebnissen, könnten durch die weitere Evaluation größerer Patientenkollektive und der Einbeziehung von immunhistochemischen und klinischen Parametern, die prognostische Relevanz des APP im Pankreas- und Kolonkarzinom untersucht werden.

Ein genauso wichtiges Ergebnis dieser Dissertation ist die Modulierbarkeit des APP-Metabolismus durch HDAC-Inhibitoren. Durch die genauere Beleuchtung des Mechanismus, konnte schlüssig das GRP78 als HDAC-abhängiger Modulator des APP-Metabolismus identifiziert werden. Diesbezüglich könnten in folgenden Versuchen mittels siRNA die GRP78-Expression supprimiert werden und parallel eine Behandlung mit HDAC-Inhibitoren durchgeführt werden. Dadurch könnte auf genetischer Ebene der Nachweis erbracht werden, dass GRP78 als hauptsächlicher APP-Bindungspartner HDAC-abhängig den APP-Metabolismus beeinflusst. Zudem könnten auch durch siRNA-Experimente selektiv einzelne Klasse-I-HDAC-Enzyme (HDAC1-3) ausschalten werden, um zu verifizieren ob der einzelne *knock-down* ausreichend ist oder mehrere HDACs notwendig sind um einen signifikanten Effekt auf die APP-Expression auszulösen. In diesem Zusammenhang, zeigen Ergebnisse von Baumeister et al. (2009), dass eine selektive Suppression von HDAC1 ausreichend ist um effektiv eine GRP78-Expression zu induzieren (Baumeister et al., 2009).

In der zweiten Studie, konnte nachgewiesen werden, dass selektiv das APP mit potenten Stammzellgenen in pluripotenten Stammzellen ko-exprimiert wird. Um die Relevanz des APP im komplexen Differenzierungsprozess zu bestätigen sind noch genauere Untersuchungen notwendig. So sollten in Folgeexperimenten *in vitro* selektiv die Genexpression des APP ausgeschaltet werden und durch *Microarray*-Analysen der Fokus auf die Modulierbarkeit von Pluripotenz- und Differenzierungsgenen gelegt werden. Ebenfalls würde auch ein *in-vivo*-Nachweis von großem Interesse sein. So könnte man mit murinen embryonalen Stammzellen von APP-(APP<sup>-/-</sup>)-*knock-out*- und APLP2-(APLP2<sup>-/-</sup>)-*knock-out*-Mäusen ein Teratom-Xenograft-Mausmodell etablieren und durch morphologisch-immunhistochemische und Western-Blot-Analysen die Modulation des Differenzierungspotentials nach APP bzw. APLP2-Verlust untersuchen. Auch könnten im

gleichen Versuch die Wachstumsunterschiede der Tumore im Vergleich zu Wildtyp-Stammzellen beurteilt werden.

Es konnte weiterhin gezeigt werden, dass durch eine Behandlung mit dem HDAC-Inhibitor VPA sowohl *in vitro* als auch *in vivo* signifikant das APP und seine Prozessierungsprodukte gesenkt werden konnten. Hier könnte der nächste Schritt in Richtung „Patient“ gewagt werden. Die Planung einer prospektiven Studie (*proof-of-concept*-Studie) mit Epilepsie-Patienten könnte hierbei eine Möglichkeit sein. In diesem Zusammenhang könnten neben VPA auch andere Antiepileptika, die gleichzeitig auch HDAC-Inhibitoren sind, getestet werden. Bereits *in vitro* konnten Carbamazepin und Levetiracetam als potente HDAC-Inhibition identifiziert werden (Eyal et al., 2004; Beutler et al., 2005). Hierbei könnten Patienten mit einer VPA-Monotherapie mit denen, die eine Kombinationstherapie bekommen, verglichen werden. Durch die Verwendung von hoch-sensitiven ELISA-Kits könnte man sAPP $\alpha$ -Plasmaspiegel analysieren und ein möglicher additiver oder potenzierender Effekt untersucht werden (Bailey et al., 2008). Dadurch könnte der Nachweis erbracht werden, dass ebenfalls im Patienten durch physiologische Dosen von HDAC-Inhibitoren der APP-Metabolismus effektiv moduliert werden kann.

## 5. Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit konnte nachgewiesen werden, dass APP in der Onkogenese von Kolon- und Pankreaskarzinomen eine große Rolle spielt. Anhand von Versuchen mit APP-überexprimierenden Zellen als auch mit APP-Deletionskonstrukten, konnte gezeigt werden, dass die N-terminale Domäne essentiell für die wachstumsfördernde Wirkung ist.

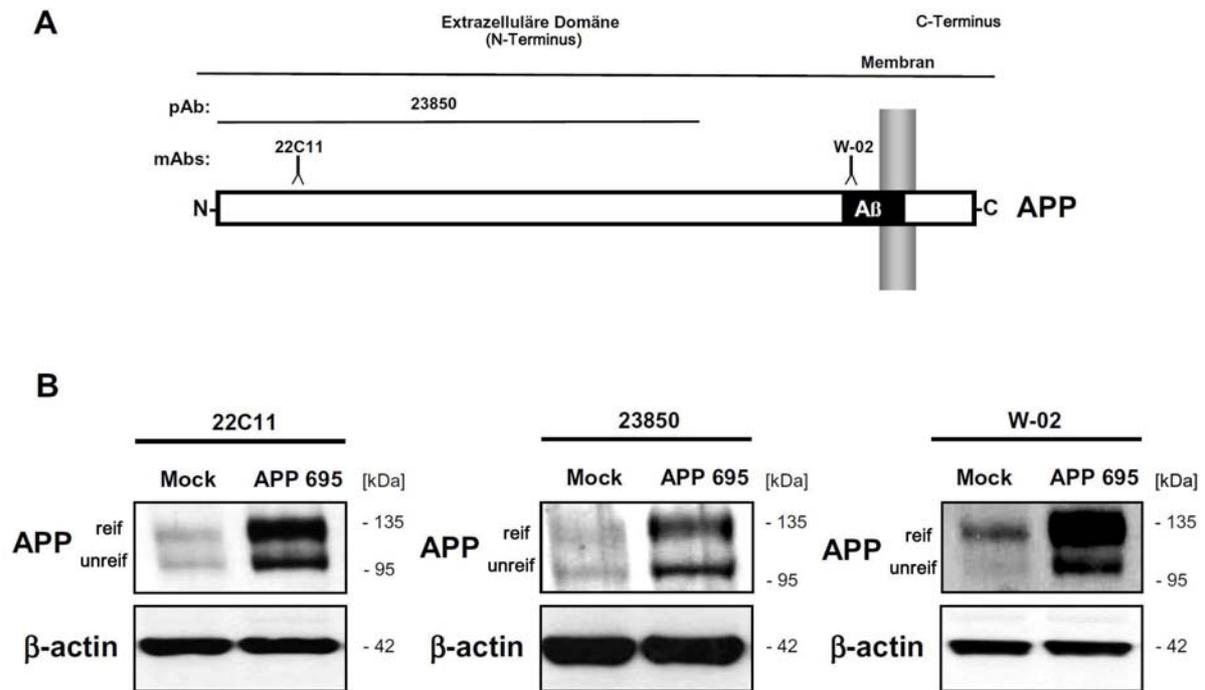
Ferner konnte das Prozessierungsprodukt sAPP $\alpha$  als spezies- und zelltypunabhängiger autokriner/parokriner Wachstumsfaktor identifiziert werden. Die selektive Verminderung der APP-Genexpression durch RNAi führte zu einem signifikanten Rückgang der Proliferation in Pankreas- und Kolonkarzinomzellen. Durch eigene Ergebnisse und durch den Nachweis der Überexpression in anderen soliden und hämatologischen Neoplasien kann das APP als eine neue therapeutische Zielstruktur zur Behandlung von Neoplasien in Betracht gezogen werden. Im Rahmen dieser Arbeit konnte zum ersten Mal gezeigt werden, dass durch Einsatz unterschiedlicher HDAC-Inhibitoren (VPA, NaB, TSA, Apicidin), die konsistent mit einer Wachstumsinhibition einhergehen, der APP-Metabolismus hoch-spezifisch über einen post-translationalen Mechanismus reguliert wird. Die mechanistische Grundlage bildet das ER-Chaperon GRP78. Durch eine HDAC-abhängige Induktion dieses molekularen Chaperons wird selektiv die APP-Reifung unterbrochen und gleichzeitig eine effektive Sekretion von sAPP $\alpha$  verhindert.

In einer zweiten Studie dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass APP zusammen mit Stammzellgenen in pluripotenten Keimzelltumoren exprimiert wird und mit dem Grad der Differenzierung signifikant herunterreguliert wird. In einem tumorbezogenen NTera-2-Xenograft-Modell konnten sowohl die spontane Differenzierung als auch die differentielle APP-Expression reproduziert werden. Hierdurch reflektierte das *in-vivo*-Modell die immunhistochemischen Untersuchungsergebnisse der testikulären Keimzelltumore. Ferner konnte gezeigt werden, dass eine Behandlung mit HDAC-Inhibitoren zu einer gleichzeitigen transkriptionellen Suppression der Stammzellsignatur, als auch zu einer post-translationalen Reduktion der APP-Expression führte. Auch konnte beobachtet werden, dass invers zur APP-Expression differenzierte Keimzelltumore signifikant stärkere GRP78-Expressionen aufwiesen. Basierend auf *in-vitro*-Daten kann vermutet werden, dass die APP-Expression während des Differenzierungsprozesses durch das GRP78-Protein auch *in vivo* post-translational moduliert wird.

Ein wesentlicher Beitrag dieser Dissertation ist der *in-vivo*-Beweis, dass durch eine orale Administration von VPA nicht nur das Tumorwachstum, sondern auch die APP-Spiegel gesenkt werden konnten. Damit konnte erstmalig nachgewiesen werden, dass physiologisch-therapeutische VPA-Dosen einen signifikanten Effekt auf den endogenen APP-Metabolismus haben. Zusammenfassend stellen diese Ergebnisse einen neuen Erklärungsansatz für die potenten HDAC-vermittelten anti-neoplastischen Wirkungen dar.

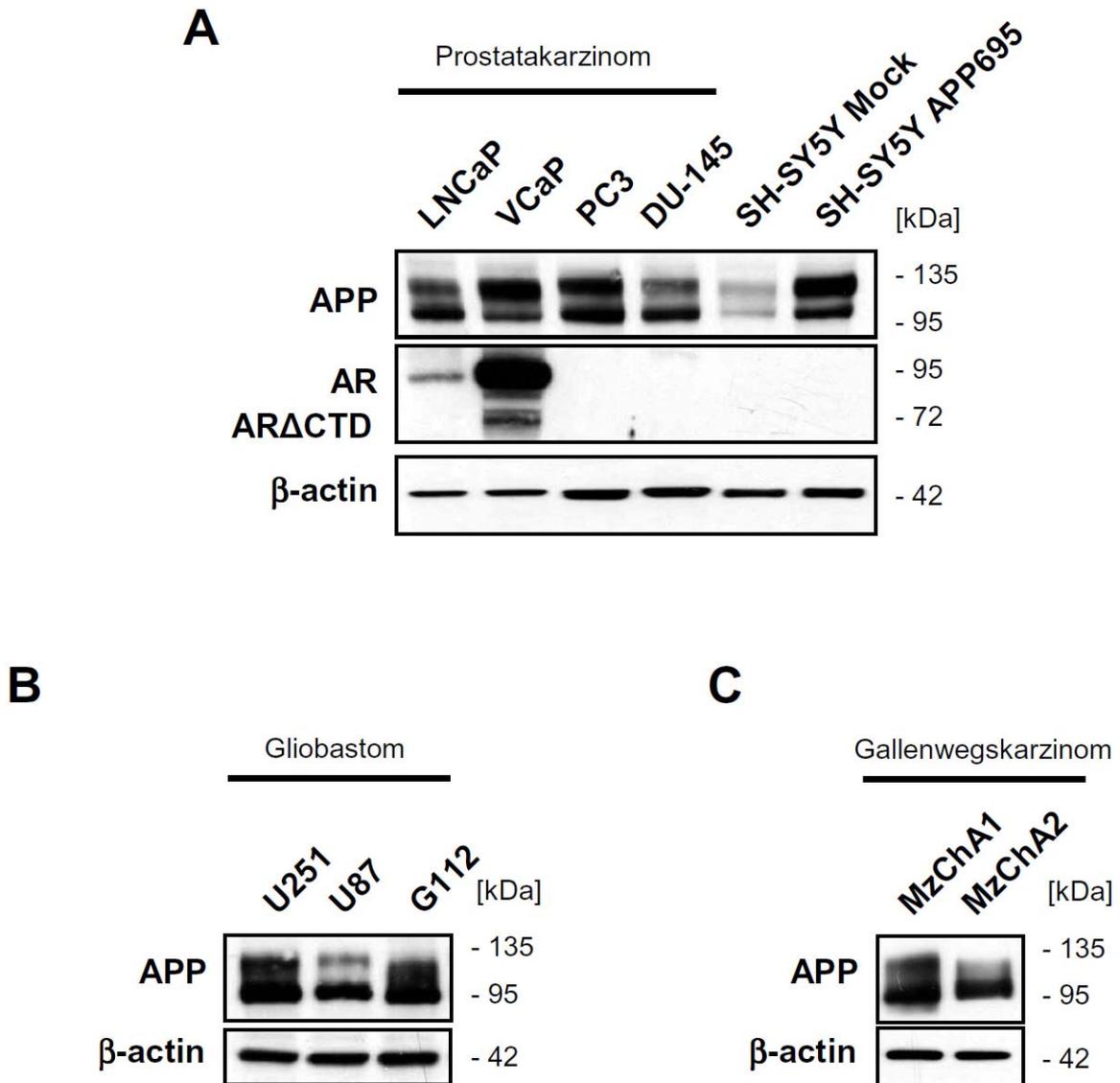
## 6. Anhang

### 6.1 Charakterisierung der APP-Antikörper durch Western-Blot-Analysen



**Abb. 6.1: Die Charakterisierung von APP-Antikörpern im Western Blot.** (A) Schematische Darstellung der verschiedenen Domänen des APP. Eingezeichnet sind die entsprechenden Bindungsstellen der verwendeten Antikörper (22C11, 23850 und W-02). In Schwarz ist die A $\beta$ -Domäne hervorgehoben. pAb: polyklonaler Antikörper; mAb: monoklonaler Antikörper. (B) Zelllysate von SH-SY5Y APP695<sub>wt</sub> und Mock-transfizierten Zellen wurden mit drei verschiedenen APP-Antikörpern untersucht. Alle verwendeten Antikörper konnten spezifisch endogenes als auch transgenes humanes APP detektieren. Der Antikörper gegen das  $\beta$ -actin diente als Kontrolle für gleich aufgetragene Proteinkonzentrationen.

## 6.2 Analyse der APP-Expression in Prostata-, Glioblastom- und cholangiozellulären Karzinom-Linien



**Abb. 6.1: Analyse der APP-Expression in Prostata-, Glioblastom-, und cholangiozellulären Karzinom-Linien.** (A) APP-Expression in Androgenrezeptor (AR)-positiven und negativen Prostatakarzinom-Zelllinien. Als Postivkontrolle wurden Lysate von SH-SY5Y Mock und APP695<sub>wf</sub>-transfizierte Zellen aufgetragen. Neben dem W-02-Antikörper (APP) wurde auch ein AR-spezifischer Antikörper (Ab-2) verwendet. (B) Lysate von Glioblastom-Zelllinien. (C) Lysate von cholangiozellulären Karzinom-Linien.

### 6.3 Analyse der APLP2-Expression nach APP-siRNA-Behandlung

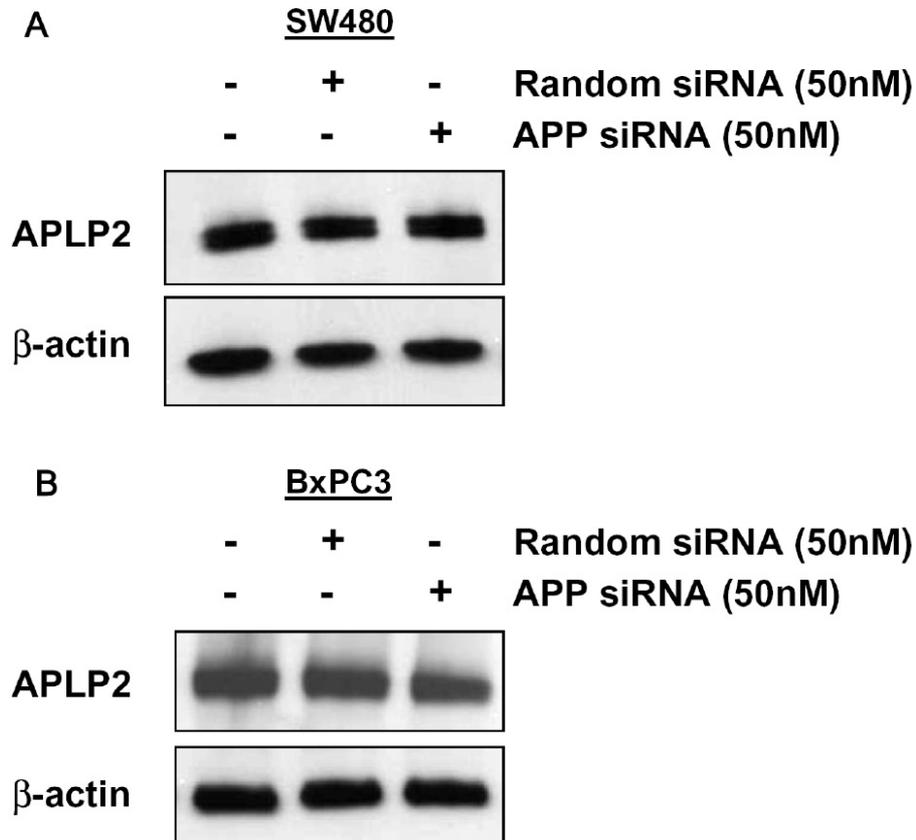


Abb. 6.3: Analyse der APLP2-Expression nach APP-siRNA-Behandlung. (A) APLP2-Expression von SW480-Zellen. (B) APLP2-Expression von BxPC-3-Zellen.

### 6.4 Zytotoxizitätsbestimmung nach VPA-Behandlung

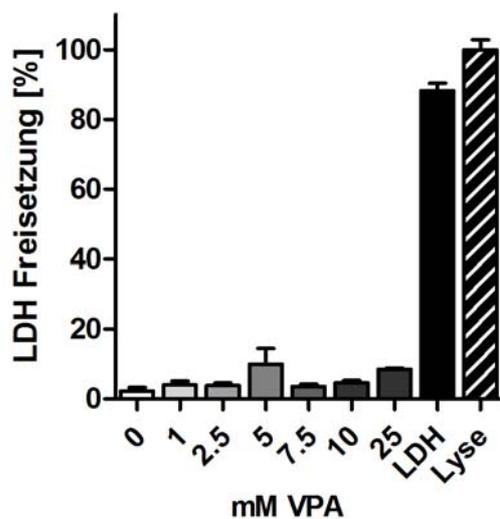
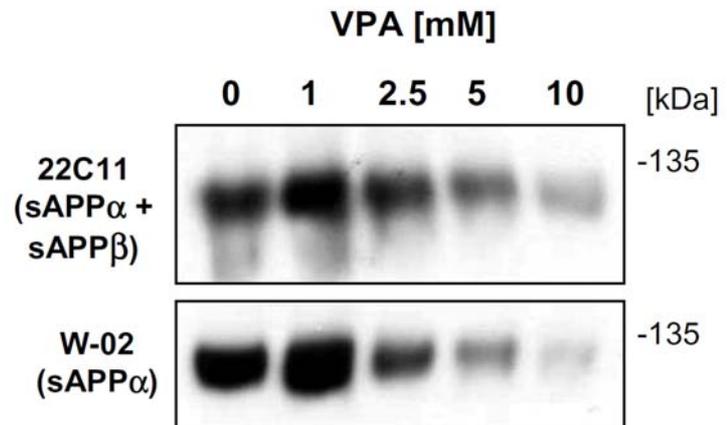


Abb. 6.4: Zytotoxizität von VPA. SW480-Zellen wurden für 24 h mit aufsteigenden VPA-Dosen behandelt. Anschließend wurde ein LDH-Assay (Promega) durchgeführt. Als Positivkontrollen wurden Zellen durch Zugabe des Lysispuffers aufgeschlossen (Lyse) und eine LDH-Positivkontrolle (BSA) verwendet. Nicht einmal bei 25 mM VPA konnte eine signifikante Zytotoxizität festgestellt werden. Die Resultate ( $n=6$ ) wurden prozentual zur maximalen LDH-Freisetzung (Lyse) wiedergegeben.

## 6.5 sAPP $\alpha$ und sAPP-Gesamt nach VPA-Behandlung

**Abb. 6.5: sAPP $\alpha$  und sAPP-Gesamt nach VPA-Behandlung.** Überstand von SW480-Zellen nach einer Behandlung mit aufsteigenden Dosen VPA. Durch Verwendung des Antikörpers 22C11 konnte eine Aussage über das Gesamt-sAPP gemacht werden. Mittels dem W-02 Antikörper konnte spezifisch sAPP $\alpha$  detektiert werden.



---

## 7. Literatur

- Aaltonen LA, Peltomaki P (1994): Genes involved in hereditary nonpolyposis colorectal carcinoma. *Anticancer Res* **14**(4B): 1657-1660
- Adami HO, Bergstrom R, Mohner M, Zatonski W, Storm H, Ekblom A, Tretli S, Teppo L, Ziegler H, Rahu M, et al. (1994): Testicular cancer in nine northern European countries. *Int J Cancer* **59**(1): 33-38
- Anandatheerthavarada HK, Biswas G, Robin MA, Avadhani NG (2003): Mitochondrial targeting and a novel transmembrane arrest of Alzheimer's amyloid precursor protein impairs mitochondrial function in neuronal cells. *J Cell Biol* **161**(1): 41-54
- Anderson JP, Esch FS, Keim PS, Sambamurti K, Lieberburg I, Robakis NK (1991): Exact cleavage site of Alzheimer amyloid precursor in neuronal PC-12 cells. *Neurosci Lett* **128**(1): 126-128
- Andre T, Boni C, Navarro M, Tabernero J, Hickish T, Topham C, Bonetti A, Clingan P, Bridgewater J, Rivera F, de Gramont A (2009): Improved overall survival with oxaliplatin, fluorouracil, and leucovorin as adjuvant treatment in stage II or III colon cancer in the MOSAIC trial. *J Clin Oncol* **27**(19): 3109-3116
- Andrews PW (1998): Teratocarcinomas and human embryology: pluripotent human EC cell lines. Review article. *APMIS* **106**(1): 158-167; discussion 167-158
- Andrews PW, Damjanov I, Simon D, Banting GS, Carlin C, Dracopoli NC, Fogh J (1984): Pluripotent embryonal carcinoma clones derived from the human teratocarcinoma cell line Tera-2. Differentiation in vivo and in vitro. *Lab Invest* **50**(2): 147-162
- Andrews PW, Matin MM, Bahrami AR, Damjanov I, Gokhale P, Draper JS (2005): Embryonic stem (ES) cells and embryonal carcinoma (EC) cells: opposite sides of the same coin. *Biochem Soc Trans* **33**(Pt 6): 1526-1530
- Annaert W, De Strooper B (2002): A cell biological perspective on Alzheimer's disease. *Annu Rev Cell Dev Biol* **18**: 25-51
- Arnold CN, Blum HE (2005): [Colon cancer: molecular pathogenesis and clinical relevance]. *Dtsch Med Wochenschr* **130**(13): 809-811
- Avilion AA, Nicolis SK, Pevny LH, Perez L, Vivian N, Lovell-Badge R (2003): Multipotent cell lineages in early mouse development depend on SOX2 function. *Genes Dev* **17**(1): 126-140
- Bai Y, Markham K, Chen F, Weerasekera R, Watts J, Horne P, Wakutani Y, Bagshaw R, Mathews PM, Fraser PE, Westaway D, St. George-Hyslop P, Schmitt-Ulms G (2008): The in Vivo Brain Interactome of the Amyloid Precursor Protein. *Mol Cell Proteomics* **7**(1): 15-34

Bailey AR, Giunta BN, Obregon D, Nikolic WV, Tian J, Sanberg CD, Sutton DT, Tan J (2008): Peripheral biomarkers in Autism: secreted amyloid precursor protein-alpha as a probable key player in early diagnosis. *Int J Clin Exp Med* **1**(4): 338-344

Baldassarre G, Romano A, Armenante F, Rambaldi M, Paoletti I, Sandomenico C, Pepe S, Staibano S, Salvatore G, De Rosa G, Persico MG, Viglietto G (1997): Expression of teratocarcinoma-derived growth factor-1 (TDGF-1) in testis germ cell tumors and its effects on growth and differentiation of embryonal carcinoma cell line NTERA2/D1. *Oncogene* **15**(8): 927-936

Baldus CD, Liyanarachchi S, Mrozek K, Auer H, Tanner SM, Guimond M, Ruppert AS, Mohamed N, Davuluri RV, Caligiuri MA, Bloomfield CD, de la Chapelle A (2004): Acute myeloid leukemia with complex karyotypes and abnormal chromosome 21: Amplification discloses overexpression of APP, ETS2, and ERG genes. *Proc Natl Acad Sci U S A* **101**(11): 3915-3920

Barnham KJ, McKinstry WJ, Multhaup G, Galatis D, Morton CJ, Curtain CC, Williamson NA, White AR, Hinds MG, Norton RS, Beyreuther K, Masters CL, Parker MW, Cappai R (2003): Structure of the Alzheimer's disease amyloid precursor protein copper binding domain. A regulator of neuronal copper homeostasis. *J Biol Chem* **278**(19): 17401-17407

Baselga J, Maerz WJ, Moy D, Miller WH, Jr., Castro L, Reuter VE, Yao TJ, Masui H, Dmitrovsky E (1993): Over-expression of transforming growth factor alpha antagonizes the anti-tumorigenic but not the differentiation actions of retinoic acid in a human teratocarcinoma cell. *Oncogene* **8**(12): 3257-3263

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*

Bayer TA, Paliga K, Weggen S, Wiestler OD, Beyreuther K, Multhaup G (1997): Amyloid precursor-like protein 1 accumulates in neuritic plaques in Alzheimer's disease. *Acta Neuropathologica* **94**(6): 519-524

Bayer TA, Cappai R, Masters CL, Beyreuther K, Multhaup G (1999): It all sticks together--the APP-related family of proteins and Alzheimer's disease. *Mol Psychiatry* **4**(6): 524-528

Bayer TA, Wirths O, Casas C, Benoit P, Tremp G, Blanchard V, Multhaup G, Schmitz C, Pradier L (2004): Intraneuronal A beta induced neuron loss in transgenic mouse models for Alzheimer's disease. *Neurobiology of Aging* **25**: S11-S11

Beutler AS, Li S, Nicol R, Walsh MJ (2005): Carbamazepine is an inhibitor of histone deacetylases. *Life Sci* **76**(26): 3107-3115

Bhaskara S, Chyla BJ, Amann JM, Knutson SK, Cortez D, Sun ZW, Hiebert SW (2008): Deletion of histone deacetylase 3 reveals critical roles in S phase progression and DNA damage control. *Mol Cell* **30**(1): 61-72

Bialer M (1991): Clinical pharmacology of valpromide. *Clin Pharmacokinet* **20**(2): 114-122

- Biedler JL, Helson L, Spengler BA (1973): Morphology and growth, tumorigenicity, and cytogenetics of human neuroblastoma cells in continuous culture. *Cancer Res* **33**(11): 2643-2652
- Bigner DD, Bigner SH, Ponten J, Westermark B, Mahaley MS, Ruoslahti E, Herschman H, Eng LF, Wikstrand CJ (1981): Heterogeneity of Genotypic and phenotypic characteristics of fifteen permanent cell lines derived from human gliomas. *J Neuropathol Exp Neurol* **40**(3): 201-229
- Blaheta RA, Cinatl J, Jr. (2002): Anti-tumor mechanisms of valproate: a novel role for an old drug. *Med Res Rev* **22**(5): 492-511
- Blaheta RA, Michaelis M, Driever PH, Cinatl J, Jr. (2005): Evolving anticancer drug valproic acid: insights into the mechanism and clinical studies. *Med Res Rev* **25**(4): 383-397
- Boffa LC, Vidali G, Mann RS, Allfrey VG (1978): Suppression of histone deacetylation in vivo and in vitro by sodium butyrate. *J Biol Chem* **253**(10): 3364-3366
- Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW (2006): Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov* **5**(9): 769-784
- Borchardt T, Camakaris J, Cappai R, Masters CL, Beyreuther K, Multhaup G (1999): Copper inhibits beta-amyloid production and stimulates the non-amyloidogenic pathway of amyloid-precursor-protein secretion. *Biochem J* **344**(Pt 2): 461-467
- Bosl GJ, Motzer RJ (1997): Testicular germ-cell cancer. *N Engl J Med* **337**(4): 242-253
- Botelho MG, Wang X, Arndt-Jovin DJ, Becker D, Jovin TM (2009): Induction of Terminal Differentiation in Melanoma Cells on Downregulation of beta-Amyloid Precursor Protein. *J Invest Dermatol*
- Bowen RL, Verdile G, Liu T, Parlow AF, Perry G, Smith MA, Martins RN, Atwood CS (2004): Luteinizing hormone, a reproductive regulator that modulates the processing of amyloid-beta precursor protein and amyloid-beta deposition. *J Biol Chem* **279**(19): 20539-20545
- Boyer LA, Mathur D, Jaenisch R (2006): Molecular control of pluripotency. *Curr Opin Genet Dev* **16**(5): 455-462
- Brodie MJ, Dichter MA (1996): Antiepileptic drugs. *N Engl J Med* **334**(3): 168-175
- Brown MS, Ye J, Rawson RB, Goldstein JL (2000): Regulated intramembrane proteolysis: a control mechanism conserved from bacteria to humans. *Cell* **100**(4): 391-398
- Brus C, Saif MW (2010): Second line therapy for advanced pancreatic adenocarcinoma: where are we and where are we going? Highlights from the "2010 ASCO Annual Meeting". Chicago, IL, USA. June 4-8, 2010. *JOP* **11**(4): 321-323
- Bunnell WL, Pham HV, Glabe CG (1998): gamma-secretase cleavage is distinct from endoplasmic reticulum degradation of the transmembrane domain of the amyloid precursor protein. *J Biol Chem* **273**(48): 31947-31955

Burgering BM, Pronk GJ, Medema JP, van der Voorn L, de Vries Smits AM, van Weeren PC, Bos JL (1993): Role of p21ras in growth factor signal transduction. *Biochem Soc Trans* **21**(4): 888-894

Burris HA, 3rd, Moore MJ, Andersen J, Green MR, Rothenberg ML, Modiano MR, Cripps MC, Portenoy RK, Storniolo AM, Tarassoff P, Nelson R, Dorr FA, Stephens CD, Von Hoff DD (1997): Improvements in survival and clinical benefit with gemcitabine as first-line therapy for patients with advanced pancreas cancer: a randomized trial. *J Clin Oncol* **15**(6): 2403-2413

Buxbaum JD, Gandy SE, Cicchetti P, Ehrlich ME, Czernik AJ, Fracasso RP, Ramabhadran TV, Unterbeck AJ, Greengard P (1990): Processing of Alzheimer beta/A4 amyloid precursor protein: modulation by agents that regulate protein phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **87**(15): 6003-6006

Byrd JC, Mrozek K, Dodge RK, Carroll AJ, Edwards CG, Arthur DC, Pettenati MJ, Patil SR, Rao KW, Watson MS, Koduru PR, Moore JO, Stone RM, Mayer RJ, Feldman EJ, Davey FR, Schiffer CA, Larson RA, Bloomfield CD (2002): Pretreatment cytogenetic abnormalities are predictive of induction success, cumulative incidence of relapse, and overall survival in adult patients with de novo acute myeloid leukemia: results from Cancer and Leukemia Group B (CALGB 8461). *Blood* **100**(13): 4325-4336

Caille I, Allinquant B, Dupont E, Bouillot C, Langer A, Muller U, Prochiantz A (2004): Soluble form of amyloid precursor protein regulates proliferation of progenitors in the adult subventricular zone. *Development* **131**(9): 2173-2181

Cao X, Sudhof TC (2004): Dissection of amyloid-beta precursor protein-dependent transcriptional transactivation. *J Biol Chem* **279**(23): 24601-24611

Carew JS, Giles FJ, Nawrocki ST (2008): Histone deacetylase inhibitors: mechanisms of cell death and promise in combination cancer therapy. *Cancer Lett* **269**(1): 7-17

Casas C, Sergeant N, Itier JM, Blanchard V, Wirths O, van der Kolk N, Vingtdoux V, van de Steeg E, Ret G, Canton T, Drobecq H, Clark A, Bonici B, Delacourte A, Benavides J, Schmitz C, Tremp G, Bayer TA, Benoit P, Pradier L (2004): Massive CA1/2 neuronal loss with intraneuronal and N-terminal truncated A beta(42) accumulation in a novel Alzheimer transgenic model. *Am J Pathol* **165**(4): 1289-1300

Chambers I, Colby D, Robertson M, Nichols J, Lee S, Tweedie S, Smith A (2003): Functional expression cloning of Nanog, a pluripotency sustaining factor in embryonic stem cells. *Cell* **113**(5): 643-655

Chen CL, Sung J, Cohen M, Chowdhury WH, Sachs MD, Li Y, Lakshmanan Y, Yung BY, Lupold SE, Rodriguez R (2006): Valproic acid inhibits invasiveness in bladder cancer but not in prostate cancer cells. *J Pharmacol Exp Ther* **319**(2): 533-542

Chen JS, Faller DV, Spanjaard RA (2003): Short-chain fatty acid inhibitors of histone deacetylases: promising anticancer therapeutics? *Curr Cancer Drug Targets* **3**(3): 219-236

- Chen Q, Kimura H, Schubert D (2002): A novel mechanism for the regulation of amyloid precursor protein metabolism. *J Cell Biol* **158**(1): 79-89
- Cheng G, Yu Z, Zhou D, Mattson MP (2002): Phosphatidylinositol-3-kinase-Akt kinase and p42/p44 mitogen-activated protein kinases mediate neurotrophic and excitoprotective actions of a secreted form of amyloid precursor protein. *Exp Neurol* **175**(2): 407-414
- Cheng L, Sung MT, Cossu-Rocca P, Jones TD, MacLennan GT, De Jong J, Lopez-Beltran A, Montironi R, Looijenga LH (2007): OCT4: biological functions and clinical applications as a marker of germ cell neoplasia. *J Pathol* **211**(1): 1-9
- Chowdhury P, Rayford PL (2000): Smoking and pancreatic disorders. *Eur J Gastroenterol Hepatol* **12**(8): 869-877
- Christensen DZ, Kraus SL, Flohr A, Cotel MC, Wirths O, Bayer TA (2008): Transient intraneuronal Abeta rather than extracellular plaque pathology correlates with neuron loss in the frontal cortex of APP/PS1KI mice. *Acta Neuropathol* **116**(6): 647-655
- Clark AT, Rodriguez RT, Bodnar MS, Abeyta MJ, Cedars MI, Turek PJ, Firpo MT, Reijo Pera RA (2004): Human STELLAR, NANOG, and GDF3 genes are expressed in pluripotent cells and map to chromosome 12p13, a hotspot for teratocarcinoma. *Stem Cells* **22**(2): 169-179
- Clark JW, Glicksman AS, Wanebo HJ (1996): Systemic and adjuvant therapy for patients with pancreatic carcinoma. *Cancer* **78**(3 Suppl): 688-693
- Collin RW, van Strien D, Leunissen JA, Martens GJ (2004): Identification and expression of the first nonmammalian amyloid-beta precursor-like protein APLP2 in the amphibian *Xenopus laevis*. *Eur J Biochem* **271**(10): 1906-1912
- Copanaki E, Chang S, Vlachos A, Tschape JA, Muller UC, Kogel D, Deller T (2010): sAPPalpha antagonizes dendritic degeneration and neuron death triggered by proteasomal stress. *Mol Cell Neurosci* **44**(4): 386-393
- Coulson EJ, Paliga K, Beyreuther K, Masters CL (2000): What the evolution of the amyloid protein precursor supergene family tells us about its function. *Neurochem Int* **36**(3): 175-184
- Cupers P, Orlans I, Craessaerts K, Annaert W, De Strooper B (2001): The amyloid precursor protein (APP)-cytoplasmic fragment generated by gamma-secretase is rapidly degraded but distributes partially in a nuclear fraction of neurones in culture. *J Neurochem* **78**(5): 1168-1178
- Dahiya R, Kwak KS, Byrd JC, Ho S, Yoon WH, Kim YS (1993): Mucin synthesis and secretion in various human epithelial cancer cell lines that express the MUC-1 mucin gene. *Cancer Res* **53**(6): 1437-1443
- Dahms SO, Hoefgen S, Roeser D, Schlott B, Guhrs KH, 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**(12): 5381-5386

de Jong J, Looijenga LH (2006): Stem cell marker OCT3/4 in tumor biology and germ cell tumor diagnostics: history and future. *Crit Rev Oncog* **12**(3-4): 171-203

de Jong J, Stoop H, Dohle GR, Bangma CH, Kliffen M, van Esser JW, van den Bent M, Kros JM, Oosterhuis JW, Looijenga LH (2005): Diagnostic value of OCT3/4 for pre-invasive and invasive testicular germ cell tumours. *J Pathol* **206**(2): 242-249

de Jong J, Stoop H, Gillis AJ, van Gurp RJ, van de Geijn GJ, Boer M, Hersmus R, Saunders PT, Anderson RA, Oosterhuis JW, Looijenga LH (2008): Differential expression of SOX17 and SOX2 in germ cells and stem cells has biological and clinical implications. *J Pathol* **215**(1): 21-30

de Ruijter AJ, van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, van Kuilenburg AB (2003): Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J* **370**(Pt 3): 737-749

Donnelly RJ, Friedhoff AJ, Beer B, Blume AJ, Vitek MP (1990): Interleukin-1 stimulates the beta-amyloid precursor protein promoter. *Cell Mol Neurobiol* **10**(4): 485-495

Drewinko B, Yand LY (1976): Restriction of CEA synthesis to the stationary phase of growth of cultured human colon carcinoma cells. *Exp Cell Res* **101**(2): 414-416

Drummond DC, Noble CO, Kirpotin DB, Guo Z, Scott GK, Benz CC (2005): Clinical development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents. *Annu Rev Pharmacol Toxicol* **45**: 495-528

Duenas-Gonzalez A, Garcia-Lopez P, Herrera LA, Medina-Franco JL, Gonzalez-Fierro A, Candelaria M (2008): The prince and the pauper. A tale of anticancer targeted agents. *Mol Cancer* **7**: 82

Dulubova I, Ho A, Huryeva I, Sudhof TC, Rizo J (2004): Three-dimensional structure of an independently folded extracellular domain of human amyloid-beta precursor protein. *Biochemistry* **43**(30): 9583-9588

Dunn KL, Espino PS, Drobnic B, He S, Davie JR (2005): The Ras-MAPK signal transduction pathway, cancer and chromatin remodeling. *Biochem Cell Biol* **83**(1): 1-14

Dyrks T, Weidemann A, Multhaup G, Salbaum JM, Lemaire HG, Kang J, Muller-Hill B, Masters CL, Beyreuther K (1988): Identification, transmembrane orientation and biogenesis of the amyloid A4 precursor of Alzheimer's disease. *EMBO J* **7**(4): 949-957

Dyrks T, Dyrks E, Masters C, Beyreuther K (1992): Membrane inserted APP fragments containing the beta A4 sequence of Alzheimer's disease do not aggregate. *FEBS Lett* **309**(1): 20-24

Ecke I, Petry F, Rosenberger A, Tauber S, Monkemeyer S, Hess I, Dullin C, Kimmina S, Pirngruber J, Johnsen SA, Uhmman A, Nitzki F, Wojnowski L, Schulz-Schaeffer W, Witt O, Hahn H (2009): Antitumor effects of a combined 5-aza-2'deoxyctidine and valproic acid treatment on rhabdomyosarcoma and medulloblastoma in Ptch mutant mice. *Cancer Res* **69**(3): 887-895

Eckert D, Nettersheim D, Heukamp LC, Kitazawa S, Biermann K, Schorle H (2008): TCam-2 but not JKT-1 cells resemble seminoma in cell culture. *Cell Tissue Res* **331**(2): 529-538

Eggert S, Paliga K, Soba P, Evin G, Masters CL, Weidemann A, Beyreuther K (2004): The proteolytic processing of the amyloid precursor protein gene family members APLP-1 and APLP-2 involves alpha-, beta-, gamma-, and epsilon-like cleavages: modulation of APLP-1 processing by n-glycosylation. *J Biol Chem* **279**(18): 18146-18156

Eehalt R, Keller P, Haass C, Thiele C, Simons K (2003): Amyloidogenic processing of the Alzheimer beta-amyloid precursor protein depends on lipid rafts. *J Cell Biol* **160**(1): 113-123

Einhorn LH, Donohue JP (1977): Chemotherapy for disseminated testicular cancer. *Urol Clin North Am* **4**(3): 407-426

Elbashir SM, Harborth J, Weber K, Tuschl T (2002): Analysis of gene function in somatic mammalian cells using small interfering RNAs. *Methods* **26**(2): 199-213

Erdman SE, Poutahidis T (2010): Cancer inflammation and regulatory T cells. *Int J Cancer* **127**(4): 768-779

Erhuma M, Kobel M, Mustafa T, Wulfanger J, Dralle H, Hoang-Vu C, Langner J, Seliger B, Kehlen A (2007): Expression of neutral endopeptidase (NEP/CD10) on pancreatic tumor cell lines, pancreatitis and pancreatic tumor tissues. *Int J Cancer* **120**(11): 2393-2400

Esposito L, Gan L, Yu GQ, Essrich C, Mucke L (2004): Intracellularly generated amyloid-beta peptide counteracts the antiapoptotic function of its precursor protein and primes proapoptotic pathways for activation by other insults in neuroblastoma cells. *J Neurochem* **91**(6): 1260-1274

Eyal S, Yagen B, Sobol E, Altschuler Y, Shmuel M, Bialer M (2004): The activity of antiepileptic drugs as histone deacetylase inhibitors. *Epilepsia* **45**(7): 737-744

Ferrari A, Ehler E, Nitsch RM, Gotz J (2000): Immature human NT2 cells grafted into mouse brain differentiate into neuronal and glial cell types. *FEBS Lett* **486**(2): 121-125

Fogh J, Wright WC, Loveless JD (1977): Absence of HeLa cell contamination in 169 cell lines derived from human tumors. *J Natl Cancer Inst* **58**(2): 209-214

Fu WN, Bertoni F, Kelsey SM, McElwaine SM, Cotter FE, Newland AC, Jia L (2003): Role of DNA methylation in the suppression of Apaf-1 protein in human leukaemia. *Oncogene* **22**(3): 451-455

Gallo P, Latronico MV, Grimaldi S, Borgia F, Todaro M, Jones P, Gallinari P, De Francesco R, Ciliberto G, Steinkuhler C, Esposito G, Condorelli G (2008): Inhibition of class I histone deacetylase with an apicidin derivative prevents cardiac hypertrophy and failure. *Cardiovasc Res* **80**(3): 416-424

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**(2): 151-163

- Glimelius B (1998): Chemotherapy in the treatment of cancer of the pancreas. *J Hepatobiliary Pancreat Surg* **5**(3): 235-241
- Gluzman Y (1981): SV40-transformed simian cells support the replication of early SV40 mutants. *Cell* **23**(1): 175-182
- Golde TE, Estus S, Usiak M, Younkin LH, Younkin SG (1990): Expression of beta amyloid protein precursor mRNAs: recognition of a novel alternatively spliced form and quantitation in Alzheimer's disease using PCR. *Neuron* **4**(2): 253-267
- Goldgaber D, Harris HW, Hla T, Maciag T, Donnelly RJ, Jacobsen JS, Vitek MP, Gajdusek DC (1989): Interleukin 1 regulates synthesis of amyloid beta-protein precursor mRNA in human endothelial cells. *Proc Natl Acad Sci U S A* **86**(19): 7606-7610
- Gottlicher M, Minucci S, Zhu P, Kramer OH, Schimpf A, Giavara S, Sleeman JP, Lo Coco F, Nervi C, Pelicci PG, Heinzl T (2001): Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J* **20**(24): 6969-6978
- Gralle M, Botelho MG, Wouters FS (2009): Neuroprotective secreted amyloid precursor protein acts by disrupting amyloid precursor protein dimers. *J Biol Chem* **284**(22): 15016-15025
- Gray CW, Patel AJ (1993): Induction of beta-amyloid precursor protein isoform mRNAs by bFGF in astrocytes. *Neuroreport* **4**(6): 811-814
- Greenberg SM, Koo EH, Selkoe DJ, Qiu WQ, Kosik KS (1994): Secreted beta-amyloid precursor protein stimulates mitogen-activated protein kinase and enhances tau phosphorylation. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(15): 7104-7108
- Greenberg SM, Qiu WQ, Selkoe DJ, Ben-Itzhak A, Kosik KS (1995): Amino-terminal region of the beta-amyloid precursor protein activates mitogen-activated protein kinase. *Neurosci Lett* **198**(1): 52-56
- Greenman C, Stephens P, Smith R, Dalgliesh GL, Hunter C, Bignell G, Davies H, Teague J, Butler A, Stevens C, Edkins S, O'Meara S, Vastrik I, Schmidt EE, Avis T, Barthorpe S, Bhamra G, Buck G, Choudhury B, Clements J, Cole J, Dicks E, Forbes S, Gray K, Halliday K, Harrison R, Hills K, Hinton J, Jenkinson A, Jones D, Menzies A, Mironenko T, Perry J, Raine K, Richardson D, Shepherd R, Small A, Tofts C, Varian J, Webb T, West S, Widaa S, Yates A, Cahill DP, Louis DN, Goldstraw P, Nicholson AG, Brasseur F, Looijenga L, Weber BL, Chiew YE, DeFazio A, Greaves MF, Green AR, Campbell P, Birney E, Easton DF, Chenevix-Trench G, Tan MH, Khoo SK, Teh BT, Yuen ST, Leung SY, Wooster R, Futreal PA, Stratton MR (2007): Patterns of somatic mutation in human cancer genomes. *Nature* **446**(7132): 153-158
- Guan K, Nayernia K, Maier LS, Wagner S, Dressel R, Lee JH, Nolte J, Wolf F, Li M, Engel W, Hasenfuss G (2006): Pluripotency of spermatogonial stem cells from adult mouse testis. *Nature* **440**(7088): 1199-1203
- Haass C, Steiner H (2002): Alzheimer disease gamma-secretase: a complex story of GxGD-type presenilin proteases. *Trends Cell Biol* **12**(12): 556-562

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**(5): 3021-3024

Hahn SA, Schmiegel WH (1998): Recent discoveries in cancer genetics of exocrine pancreatic neoplasia. *Digestion* **59**(5): 493-501

Hahn WC, Weinberg RA (2002): Rules for making human tumor cells. *N Engl J Med* **347**(20): 1593-1603

Hale LP, Markert ML (2004): Corticosteroids regulate epithelial cell differentiation and Hassall body formation in the human thymus. *J Immunol* **172**(1): 617-624

Hamilton SR, Aaltonen LA (Eds.): *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Tumours of the Digestive System*. IARC Press, Lyon 2000.

Hammond SM, Caudy AA, Hannon GJ (2001): Post-transcriptional gene silencing by double-stranded RNA. *Nat Rev Genet* **2**(2): 110-119

Han JW, Ahn SH, Park SH, Wang SY, Bae GU, Seo DW, Kwon HK, 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**(21): 6068-6074

Hanahan D, Weinberg RA (2000): The hallmarks of cancer. *Cell* **100**(1): 57-70

Hanahan D, Weinberg RA (2011): Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* **144**(5): 646-674

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**(21): 7032-7037

Hare JF (2001): Protease inhibitors divert amyloid precursor protein to the secretory pathway. *Biochem Biophys Res Commun* **281**(5): 1298-1303

Harrington EA, Bennett MR, Fanidi A, Evan GI (1994): c-Myc-induced apoptosis in fibroblasts is inhibited by specific cytokines. *EMBO J* **13**(14): 3286-3295

Hart AH, Hartley L, Parker K, Ibrahim M, Looijenga LH, Pauchnik M, Chow CW, Robb L (2005): The pluripotency homeobox gene NANOG is expressed in human germ cell tumors. *Cancer* **104**(10): 2092-2098

Hartmann T (1999): Intracellular biology of Alzheimer's disease amyloid beta peptide. *Eur Arch Psychiatry Clin Neurosci* **249**(6): 291-298

Haven CJ, Howell VM, Eilers PH, Dunne R, Takahashi M, van Puijenbroek M, Furge K, Kievit J, Tan MH, 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**(20): 7405-7411

- Heber S, Herms J, Gajic V, Hainfellner J, Aguzzi A, Rulicke T, von Kretschmar H, von Koch C, Sisodia S, Tremml P, Lipp HP, Wolfer DP, Muller U (2000): Mice with combined gene knock-outs reveal essential and partially redundant functions of amyloid precursor protein family members. *J Neurosci* **20**(21): 7951-7963
- Heidenreich A, Sesterhenn IA, Mostofi FK, Moul JW (1998): Prognostic risk factors that identify patients with clinical stage I nonseminomatous germ cell tumors at low risk and high risk for metastasis. *Cancer* **83**(5): 1002-1011
- Henry TR (2003): The history of valproate in clinical neuroscience. *Psychopharmacol Bull* **37 Suppl 2**: 5-16
- Hilbich C, Monning U, Grund C, Masters CL, Beyreuther K (1993): Amyloid-like properties of peptides flanking the epitope of amyloid precursor protein-specific monoclonal antibody 22C11. *J Biol Chem* **268**(35): 26571-26577
- Hoei-Hansen CE, Sehested A, Juhler M, Lau YF, Skakkebaek NE, Laursen H, Rajpert-de Meys E (2006): New evidence for the origin of intracranial germ cell tumours from primordial germ cells: expression of pluripotency and cell differentiation markers. *J Pathol* **209**(1): 25-33
- Horoszewicz JS, Leong SS, Kawinski E, Karr JP, Rosenthal H, Chu TM, Mirand EA, Murphy GP (1983): LNCaP model of human prostatic carcinoma. *Cancer Res* **43**(4): 1809-1818
- Horwich A, Shipley J, Huddart R (2006): Testicular germ-cell cancer. *Lancet* **367**(9512): 754-765
- Hoshino T, Nakaya T, Araki W, Suzuki K, Suzuki T, Mizushima T (2007): Endoplasmic reticulum chaperones inhibit the production of amyloid-beta peptides. *Biochem J* **402**(3): 581-589
- Hrzenjak A, Moinfar F, Kremser ML, Strohmeier B, Staber PB, Zatloukal K, Denk H (2006): Valproate inhibition of histone deacetylase 2 affects differentiation and decreases proliferation of endometrial stromal sarcoma cells. *Mol Cancer Ther* **5**(9): 2203-2210
- Hsu FD, Nielsen TO, Alkushi A, Dupuis B, Huntsman D, Liu CL, van de Rijn M, Gilks CB (2002): Tissue microarrays are an effective quality assurance tool for diagnostic immunohistochemistry. *Mod Pathol* **15**(12): 1374-1380
- Hsu WM, Hsieh FJ, Jeng YM, Kuo ML, Tsao PN, Lee H, Lin MT, Lai HS, Chen CN, Lai DM, Chen WJ (2005): GRP78 expression correlates with histologic differentiation and favorable prognosis in neuroblastic tumors. *Int J Cancer* **113**(6): 920-927
- Huang BH, Laban M, Leung CH, Lee L, Lee CK, Salto-Tellez M, Raju GC, Hooi SC (2005): Inhibition of histone deacetylase 2 increases apoptosis and p21Cip1/WAF1 expression, independent of histone deacetylase 1. *Cell Death Differ* **12**(4): 395-404
- Huang TT, Chen JY, Tseng CE, Su YC, Ho HC, Lee MS, Chang CT, Wong YK, Chen HR (2010): Decreased GRP78 protein expression is a potential prognostic marker of oral squamous cell carcinoma in Taiwan. *J Formos Med Assoc* **109**(5): 326-337

- Huo R, Zhu YF, Ma X, Lin M, Zhou ZM, Sha JH (2004): Differential expression of glucose-regulated protein 78 during spermatogenesis. *Cell Tissue Res* **316**(3): 359-367
- Huttunen HJ, Guenette SY, Peach C, Greco C, Xia W, Kim DY, Barren C, Tanzi RE, Kovacs DM (2007): HtrA2 regulates beta-amyloid precursor protein (APP) metabolism through endoplasmic reticulum-associated degradation. *J Biol Chem* **282**(38): 28285-28295
- Hutvagner G, Zamore PD (2002): RNAi: nature abhors a double-strand. *Curr Opin Genet Dev* **12**(2): 225-232
- Hyslop L, Stojkovic M, Armstrong L, Walter T, Stojkovic P, Przyborski S, Herbert M, Murdoch A, Strachan T, Lako M (2005): Downregulation of NANOG induces differentiation of human embryonic stem cells to extraembryonic lineages. *Stem Cells* **23**(8): 1035-1043
- Ida N, Hartmann T, Pantel J, Schroder J, Zerfass R, Forstl H, Sandbrink R, Masters CL, Beyreuther K (1996): Analysis of heterogeneous A4 peptides in human cerebrospinal fluid and blood by a newly developed sensitive Western blot assay. *J Biol Chem* **271**(37): 22908-22914
- Igawa T, Lin FF, Lee MS, Karan D, Batra SK, Lin MF (2002): Establishment and characterization of androgen-independent human prostate cancer LNCaP cell model. *Prostate* **50**(4): 222-235
- Ishiguro M, Ohsawa I, Takamura C, Morimoto T, Kohsaka S (1998): Secreted form of beta-amyloid precursor protein activates protein kinase C and phospholipase Cgamma1 in cultured embryonic rat neocortical cells. *Brain Res Mol Brain Res* **53**(1-2): 24-32
- Ivanova N, Dobrin R, Lu R, Kotenko I, Levorse J, DeCoste C, Schafer X, Lun Y, Lemischka IR (2006): Dissecting self-renewal in stem cells with RNA interference. *Nature* **442**(7102): 533-538
- Jacobsen KT, Iverfeldt K (2009): Amyloid precursor protein and its homologues: a family of proteolysis-dependent receptors. *Cell Mol Life Sci* **66**(14): 2299-2318
- 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**(1): 10-30
- Jhandier MN, Kruglov EA, Lavoie EG, Sevigny J, Dranoff JA (2005): Portal fibroblasts regulate the proliferation of bile duct epithelia via expression of NTPDase2. *J Biol Chem* **280**(24): 22986-22992
- Jin LW, Ninomiya H, Roch JM, Schubert D, Masliah E, Otero DA, Saitoh T (1994): Peptides containing the RERMS sequence of amyloid beta/A4 protein precursor bind cell surface and promote neurite extension. *J Neurosci* **14**(9): 5461-5470
- Jones J, Juengel E, Mickuckyte A, Hudak L, Wedel S, Jonas D, Blaheta RA (2009): The histone deacetylase inhibitor valproic acid alters growth properties of renal cell carcinoma in vitro and in vivo. *J Cell Mol Med* **13**(8B): 2376-2385

- Jorgensen MM, Jensen ON, Holst HU, Hansen JJ, Corydon TJ, Bross P, Bolund L, Gregersen N (2000): Grp78 is involved in retention of mutant low density lipoprotein receptor protein in the endoplasmic reticulum. *J Biol Chem* **275**(43): 33861-33868
- Kadia TM, Yang H, Ferrajoli A, Maddipotti S, Schroeder C, Madden TL, Holleran JL, Egorin MJ, Ravandi F, Thomas DA, Newsome W, Sanchez-Gonzalez B, Zwiebel JA, Espinoza-Delgado I, Kantarjian HM, Garcia-Manero G (2011): A phase I study of vorinostat in combination with idarubicin in relapsed or refractory leukaemia. *Br J Haematol* **150**(1): 72-82
- Kaighn ME, Narayan KS, Ohnuki Y, Lechner JF, Jones LW (1979): Establishment and characterization of a human prostatic carcinoma cell line (PC-3). *Invest Urol* **17**(1): 16-23
- Kallioniemi OP, Wagner U, Kononen J, Sauter G (2001): Tissue microarray technology for high-throughput molecular profiling of cancer. *Hum Mol Genet* **10**(7): 657-662
- Kaneko M, Koike H, Saito R, Kitamura Y, Okuma Y, Nomura Y (2010): Loss of HRD1-mediated protein degradation causes amyloid precursor protein accumulation and amyloid-beta generation. *J Neurosci* **30**(11): 3924-3932
- Kang J, Lemaire HG, Unterbeck A, Salbaum JM, Masters CL, Grzeschik KH, Multhaup G, Beyreuther K, Muller-Hill B (1987): The precursor of Alzheimer's disease amyloid A4 protein resembles a cell-surface receptor. *Nature* **325**(6106): 733-736
- Kantelhardt SR, Carls W, de Vries AH, Hagen GM, Jovin TM, Schulz-Schaeffer W, Rohde V, Giese A, Arndt-Jovin DJ (2010): Specific visualization of glioma cells in living low-grade tumor tissue. *PLoS One* **5**(6): e11323
- Kehler J, Tolkunova E, Koschorz B, Pesce M, Gentile L, Boiani M, Lomeli H, Nagy A, McLaughlin KJ, Scholer HR, Tomilin A (2004): Oct4 is required for primordial germ cell survival. *EMBO Rep* **5**(11): 1078-1083
- Kelly WK, Marks PA (2005): Drug insight: Histone deacetylase inhibitors--development of the new targeted anticancer agent suberoylanilide hydroxamic acid. *Nat Clin Pract Oncol* **2**(3): 150-157
- Khan N, Jeffers M, Kumar S, Hackett C, Boldog F, Khramtsov N, Qian X, Mills E, Berghs SC, Carey N, Finn PW, Collins LS, Tumber A, Ritchie JW, Jensen PB, Lichenstein HS, Sehested M (2008): Determination of the class and isoform selectivity of small-molecule histone deacetylase inhibitors. *Biochem J* **409**(2): 581-589
- Knudson AG, Jr. (1971): Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci U S A* **68**(4): 820-823
- Knutson SK, Chyla BJ, Amann JM, Bhaskara S, Huppert SS, Hiebert SW (2008): Liver-specific deletion of histone deacetylase 3 disrupts metabolic transcriptional networks. *EMBO J* **27**(7): 1017-1028
- 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**(5): 727-732

- Kojro E, Fahrenholz F (2005): The non-amyloidogenic pathway: structure and function of alpha-secretases. *Subcell Biochem* **38**: 105-127
- Kononen J, Bubendorf L, Kallioniemi A, Barlund M, Schraml P, Leighton S, Torhorst J, Mihatsch MJ, Sauter G, Kallioniemi OP (1998): Tissue microarrays for high-throughput molecular profiling of tumor specimens. *Nat Med* **4**(7): 844-847
- Kopan R, Ilagan MX (2004): Gamma-secretase: proteasome of the membrane? *Nat Rev Mol Cell Biol* **5**(6): 499-504
- Korenchuk S, Lehr JE, L MC, Lee YG, Whitney S, Vessella R, Lin DL, Pienta KJ (2001): VCaP, a cell-based model system of human prostate cancer. *In Vivo* **15**(2): 163-168
- Korkola JE, Houldsworth J, Dobrzynski D, Olshen AB, Reuter VE, Bosl GJ, Chaganti RS (2005): Gene expression-based classification of nonseminomatous male germ cell tumors. *Oncogene* **24**(32): 5101-5107
- Krämer OH, Zhu P, Ostendorff HP, Golebiewski M, Tiefenbach J, Peters MA, Brill B, Groner B, Bach I, Heinzel T, Göttlicher M (2003): The histone deacetylase inhibitor valproic acid selectively induces proteasomal degradation of HDAC2. *EMBO J* **22**(13): 3411-3420
- Krause K, Karger S, Sheu SY, Aigner T, Kursawe R, Gimm O, Schmid KW, Dralle H, Fuhrer D (2008): Evidence for a role of the amyloid precursor protein in thyroid carcinogenesis. *J Endocrinol* **198**(2): 291-299
- Kuan YH, Gruebl T, Soba P, Eggert S, Nestic I, Back S, Kirsch J, Beyreuther K, Kins S (2006): PAT1a modulates intracellular transport and processing of amyloid precursor protein (APP), APLP1, and APLP2. *J Biol Chem* **281**(52): 40114-40123
- Kuendgen A, Gattermann N (2007): Valproic acid for the treatment of myeloid malignancies. *Cancer* **110**(5): 943-954
- Kuhn PH, Wang H, Dislich B, Colombo A, Zeitschel U, Ellwart JW, Kremmer E, Rossner S, Lichtenthaler SF (2010): ADAM10 is the physiologically relevant, constitutive alpha-secretase of the amyloid precursor protein in primary neurons. *EMBO J* **29**(17): 3020-3032
- Kwak YD, Brannen CL, Qu T, Kim HM, Dong X, Soba P, Majumdar A, Kaplan A, Beyreuther K, Sugaya K (2006): Amyloid precursor protein regulates differentiation of human neural stem cells. *Stem Cells Dev* **15**(3): 381-389
- Kwak YD, Dantuma E, Merchant S, Bushnev S, Sugaya K (2010): Amyloid-beta Precursor Protein Induces Glial Differentiation of Neural Progenitor Cells by Activation of the IL-6/gp130 Signaling Pathway. *Neurotox Res*
- 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**(3): 2073-2080
- Lachance C, Fortier M, Thimon V, Sullivan R, Bailey JL, Leclerc P (2010): Localization of Hsp60 and Grp78 in the human testis, epididymis and mature spermatozoa. *Int J Androl* **33**(1): 33-44

- Laemmli UK (1970): Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. *Nature* **227**(5259): 680-685
- Lammich S, Kojro E, Postina R, Gilbert S, Pfeiffer R, Jasionowski M, Haass C, Fahrenholz F (1999): Constitutive and regulated alpha-secretase cleavage of Alzheimer's amyloid precursor protein by a disintegrin metalloprotease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **96**(7): 3922-3927
- Langer R, Feith M, Siewert JR, Wester HJ, Hoefler H (2008): Expression and clinical significance of glucose regulated proteins GRP78 (BiP) and GRP94 (GP96) in human adenocarcinomas of the esophagus. *BMC Cancer* **8**: 70
- Lee AS (2007): GRP78 induction in cancer: therapeutic and prognostic implications. *Cancer Res* **67**(8): 3496-3499
- Lee J, Kim HK, Rho JY, Han YM, Kim J (2006): The human OCT-4 isoforms differ in their ability to confer self-renewal. *J Biol Chem* **281**(44): 33554-33565
- Leibovitz A, Stinson JC, McCombs WB, 3rd, McCoy CE, Mazur KC, Mabry ND (1976): Classification of human colorectal adenocarcinoma cell lines. *Cancer Res* **36**(12): 4562-4569
- Li H, Collado M, Villasante A, Strati K, Ortega S, Canamero M, Blasco MA, Serrano M (2009): The Ink4/Arf locus is a barrier for iPS cell reprogramming. *Nature* **460**(7259): 1136-1139
- Li H, Wang B, Wang Z, Guo Q, Tabuchi K, Hammer RE, Sudhof TC, Zheng H (2010): Soluble amyloid precursor protein (APP) regulates transthyretin and Klotho gene expression without rescuing the essential function of APP. *Proc Natl Acad Sci U S A*
- Li XN, Shu Q, Su JM, Perlaky L, Blaney SM, Lau CC (2005): Valproic acid induces growth arrest, apoptosis, and senescence in medulloblastomas by increasing histone hyperacetylation and regulating expression of p21Cip1, CDK4, and CMYC. *Mol Cancer Ther* **4**(12): 1912-1922
- Licht P, Russu V, Lehmeier S, Moll J, Siebzehnruhl E, Wildt L (2002): Intrauterine microdialysis reveals cycle-dependent regulation of endometrial insulin-like growth factor binding protein-1 secretion by human chorionic gonadotropin. *Fertil Steril* **78**(2): 252-258
- Lieber M, Mazzetta J, Nelson-Rees W, Kaplan M, Todaro G (1975): Establishment of a continuous tumor-cell line (panc-1) from a human carcinoma of the exocrine pancreas. *Int J Cancer* **15**(5): 741-747
- Lionetto R, Pugliese V, Bruzzi P, Rosso R (1995): No standard treatment is available for advanced pancreatic cancer. *Eur J Cancer* **31A**(6): 882-887
- Liu T, Kuljaca S, Tee A, Marshall GM (2006): Histone deacetylase inhibitors: multifunctional anticancer agents. *Cancer Treat Rev* **32**(3): 157-165
- Looijenga LH (2009a): [Advances in basic research on testicular germ cell tumors : clinical implications]. *Urologe A* **48**(4): 350-358

- Looijenga LH (2009b): Human testicular (non)seminomatous germ cell tumours: the clinical implications of recent pathobiological insights. *J Pathol* **218**(2): 146-162
- Looijenga LH, Stoop H, de Leeuw HP, de Gouveia Brazao CA, Gillis AJ, van Roozendaal KE, van Zoelen EJ, Weber RF, Wolffenbittel KP, van Dekken H, Honecker F, Bokemeyer C, Perlman EJ, Schneider DT, Kononen J, Sauter G, Oosterhuis JW (2003a): POU5F1 (OCT3/4) identifies cells with pluripotent potential in human germ cell tumors. *Cancer Res* **63**(9): 2244-2250
- Looijenga LH, Zafarana G, Grygalewicz B, Summersgill B, Debiec-Rychter M, Veltman J, Schoenmakers EF, Rodriguez S, Jafer O, Clark J, van Kessel AG, Shipley J, van Gurp RJ, Gillis AJ, Oosterhuis JW (2003b): Role of gain of 12p in germ cell tumour development. *APMIS* **111**(1): 161-171; discussion 172-163
- Loscher W (2002): Basic pharmacology of valproate: a review after 35 years of clinical use for the treatment of epilepsy. *CNS Drugs* **16**(10): 669-694
- Macdonald JS (2004): Clinical overview: adjuvant therapy of gastrointestinal cancer. *Cancer Chemother Pharmacol* **54 Suppl 1**: S4-11
- Maerz WJ, Baselga J, Reuter VE, Mellado B, Myers ML, Bosl GJ, Spinella MJ, Dmitrovsky E (1998): FGF4 dissociates anti-tumorigenic from differentiation signals of retinoic acid in human embryonal carcinomas. *Oncogene* **17**(6): 761-767
- Maesako Y, Uchiyama T, Ohno H (2003): Comparison of gene expression profiles of lymphoma cell lines from transformed follicular lymphoma, Burkitt's lymphoma and de novo diffuse large B-cell lymphoma. *Cancer Sci* **94**(9): 774-781
- Marks PA, Richon VM, Rifkind RA (2000): Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells. *J Natl Cancer Inst* **92**(15): 1210-1216
- Marutle A, Ohmitsu M, Nilbratt M, Greig NH, Nordberg A, Sugaya K (2007): Modulation of human neural stem cell differentiation in Alzheimer (APP23) transgenic mice by phenserine. *Proc Natl Acad Sci U S A* **104**(30): 12506-12511
- Maruyama K, Tagawa K, Kawamura Y, Asada H, Ishiura S, Obata K (1995): Secretion of Alzheimer beta/A4 protein (1-40) and intracellular retention of beta/A4 protein (1-42) in transfected COS cells. *Biochem Biophys Res Commun* **207**(3): 971-977
- Mickey DD, Stone KR, Wunderli H, Mickey GH, Vollmer RT, Paulson DF (1977): Heterotransplantation of a human prostatic adenocarcinoma cell line in nude mice. *Cancer Res* **37**(11): 4049-4058
- Midgley R, Kerr D (1999): Colorectal cancer. *Lancet* **353**(9150): 391-399
- Mizuno Y, Gotoh A, Kamidono S, Kitazawa S (1993): [Establishment and characterization of a new human testicular germ cell tumor cell line (TCam-2)]. *Nippon Hinyokika Gakkai Zasshi* **84**(7): 1211-1218

- 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 U S A* **85**(24): 9811-9815
- Moch H, Kononen T, Kallioniemi OP, Sauter G (2001): Tissue microarrays: what will they bring to molecular and anatomic pathology? *Adv Anat Pathol* **8**(1): 14-20
- Montgomery RL, Hsieh J, Barbosa AC, Richardson JA, Olson EN (2009): Histone deacetylases 1 and 2 control the progression of neural precursors to neurons during brain development. *Proc Natl Acad Sci U S A* **106**(19): 7876-7881
- Morales-Corraliza J, Mazzella MJ, Berger JD, Diaz NS, Choi JH, Levy E, Matsuoka Y, Planel E, Mathews PM (2009): In vivo turnover of tau and APP metabolites in the brains of wild-type and Tg2576 mice: greater stability of sAPP in the beta-amyloid depositing mice. *PLoS One* **4**(9): e7134
- Morrison TB, Weis JJ, Wittwer CT (1998): Quantification of low-copy transcripts by continuous SYBR Green I monitoring during amplification. *Biotechniques* **24**(6): 954-958, 960, 962
- Müller S, Krämer OH (2010): Inhibitors of HDACs--effective drugs against cancer? *Curr Cancer Drug Targets* **10**(2): 210-228
- Müller U, Weyer S, Klevanski M, Schaller KL, Delekate A, Voikar V, Korte M, Wolfer DP, Caldwell J (2010): APP and APLP2 provide essential functions at PNS and CNS synapses mediating neuromuscular transmission, spatial learning and synaptic plasticity *Vortrag auf dem Society for Neuroscience, 12-16 November 2010*
- Murakami H, Masui H (1980): Hormonal control of human colon carcinoma cell growth in serum-free medium. *Proc Natl Acad Sci U S A* **77**(6): 3464-3468
- Murr MM, Sarr MG, Oishi AJ, van Heerden JA (1994): Pancreatic cancer. *CA Cancer J Clin* **44**(5): 304-318
- Muto T, Bussey HJ, Morson BC (1975): The evolution of cancer of the colon and rectum. *Cancer* **36**(6): 2251-2270
- Mutze K, Langer R, Becker K, Ott K, Novotny A, Luber B, Hapfelmeier A, Gottlicher M, Hofler H, Keller G (2010): Histone Deacetylase (HDAC) 1 and 2 Expression and Chemotherapy in Gastric Cancer. *Ann Surg Oncol* **17**(12): 3336-3343
- Nakanishi K, Sudo T, Morishima N (2005): Endoplasmic reticulum stress signaling transmitted by ATF6 mediates apoptosis during muscle development. *J Cell Biol* **169**(4): 555-560
- Naumann N, Alpar A, Ueberham U, Arendt T, Gartner U (2010): Transgenic expression of human wild-type amyloid precursor protein decreases neurogenesis in the adult hippocampus. *Hippocampus* **20**(8): 971-979
- Nikolaev A, McLaughlin T, O'Leary DD, Tessier-Lavigne M (2009): APP binds DR6 to trigger axon pruning and neuron death via distinct caspases. *Nature* **457**(7232): 981-989

- 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**(4): 879-886
- Niwa H, Miyazaki J, Smith AG (2000): Quantitative expression of Oct-3/4 defines differentiation, dedifferentiation or self-renewal of ES cells. *Nat Genet* **24**(4): 372-376
- Ohsawa I, Takamura C, Morimoto T, Ishiguro M, Kohsaka S (1999): Amino-terminal region of secreted form of amyloid precursor protein stimulates proliferation of neural stem cells. *Eur J Neurosci* **11**(6): 1907-1913
- Oltersdorf T, Ward PJ, Henriksson T, Beattie EC, Neve R, Lieberburg I, Fritz LC (1990): The Alzheimer amyloid precursor protein. Identification of a stable intermediate in the biosynthetic/degradative pathway. *J Biol Chem* **265**(8): 4492-4497
- Omisanjo OA, Biermann K, Hartmann S, Heukamp LC, Sonnack V, Hild A, Brehm R, Bergmann M, Weidner W, Steger K (2007): DNMT1 and HDAC1 gene expression in impaired spermatogenesis and testicular cancer. *Histochem Cell Biol* **127**(2): 175-181
- Pfaffl MW, Horgan GW, Dempfle L (2002): Relative expression software tool (REST) for group-wise comparison and statistical analysis of relative expression results in real-time PCR. *Nucleic Acids Res* **30**(9): e36
- Phiel CJ, Zhang F, Huang EY, Guenther MG, Lazar MA, Klein PS (2001): Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *J Biol Chem* **276**(39): 36734-36741
- Pietrzik CU, Hoffmann J, Stober K, Chen CY, Bauer C, Otero DA, Roch JM, 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**(4): 1770-1775
- Ponten J, Macintyre EH (1968): Long term culture of normal and neoplastic human glia. *Acta Pathol Microbiol Scand* **74**(4): 465-486
- Porayette P, Gallego MJ, Kaltcheva MM, Meethal SV, Atwood CS (2007): Amyloid-beta precursor protein expression and modulation in human embryonic stem cells: a novel role for human chorionic gonadotropin. *Biochem Biophys Res Commun* **364**(3): 522-527
- Postina R (2008): A closer look at alpha-secretase. *Curr Alzheimer Res* **5**(2): 179-186
- Postina R, Schroeder A, Dewachter I, Bohl J, Schmitt U, Kojro E, Prinzen C, Endres K, Hiemke C, Blessing M, Flamez P, Dequenue A, Godaux E, van Leuven F, Fahrenholz F (2004): A disintegrin-metalloproteinase prevents amyloid plaque formation and hippocampal defects in an Alzheimer disease mouse model. *J Clin Invest* **113**(10): 1456-1464
- Przyborski SA (2005): Differentiation of human embryonic stem cells after transplantation in immune-deficient mice. *Stem Cells* **23**(9): 1242-1250

- Qing H, He G, Ly PT, Fox CJ, Staufenbiel M, Cai F, Zhang Z, Wei S, Sun X, Chen CH, Zhou W, Wang K, Song W (2008): Valproic acid inhibits Abeta production, neuritic plaque formation, and behavioral deficits in Alzheimer's disease mouse models. *J Exp Med* **205**(12): 2781-2789
- Qiu W, Kohen-Avramoglu R, Mhapsekar S, Tsai J, Austin RC, Adeli K (2005): Glucosamine-induced endoplasmic reticulum stress promotes ApoB100 degradation: evidence for Grp78-mediated targeting to proteasomal degradation. *Arterioscler Thromb Vasc Biol* **25**(3): 571-577
- Radatz M, Ehlers K, Yagen B, Bialer M, Nau H (1998): Valnoctamide, valpromide and valnoctic acid are much less teratogenic in mice than valproic acid. *Epilepsy Res* **30**(1): 41-48
- Rajkumar T (2001): Growth factors and growth factor receptors in cancer. *Curr Sci* **81**(5): 535-541
- Rashid S, Pilecka I, Torun A, Olchowik M, Bielinska B, Miaczynska M (2009): Endosomal adaptor proteins APPL1 and APPL2 are novel activators of beta-catenin/TCF-mediated transcription. *J Biol Chem* **284**(27): 18115-18128
- Redinbaugh MG, Turley RB (1986): Adaptation of the bicinchoninic acid protein assay for use with microtiter plates and sucrose gradient fractions. *Anal Biochem* **153**(2): 267-271
- Reinhard C, Hebert SS, De Strooper B (2005): The amyloid-beta precursor protein: integrating structure with biological function. *EMBO J* **24**(23): 3996-4006
- Reiss M, Stash EB, Vellucci VF, Zhou ZL (1991): Activation of the autocrine transforming growth factor alpha pathway in human squamous carcinoma cells. *Cancer Res* **51**(23 Pt 1): 6254-6262
- Repetto E, Yoon IS, Zheng H, Kang DE (2007): Presenilin 1 regulates epidermal growth factor receptor turnover and signaling in the endosomal-lysosomal pathway. *J Biol Chem* **282**(43): 31504-31516
- Roch JM, Masliah E, Roch-Levecq AC, Sundsmo MP, Otero DA, Veinbergs I, Saitoh T (1994): Increase of synaptic density and memory retention by a peptide representing the trophic domain of the amyloid beta/A4 protein precursor. *Proc Natl Acad Sci U S A* **91**(16): 7450-7454
- Roe CM, Fitzpatrick AL, Xiong C, Sieh W, Kuller L, Miller JP, Williams MM, Kopan R, Behrens MI, Morris JC (2009): Cancer linked to Alzheimer disease but not vascular dementia. *Neurology* **74**(2): 106-112
- Rogers JT, Leiter LM, McPhee J, Cahill CM, Zhan SS, Potter H, Nilsson LN (1999): Translation of the alzheimer amyloid precursor protein mRNA is up-regulated by interleukin-1 through 5'-untranslated region sequences. *J Biol Chem* **274**(10): 6421-6431
- Roghani M, Becherer JD, Moss ML, Atherton RE, Erdjument-Bromage H, Arribas J, Blackburn RK, Weskamp G, Tempst P, Blobel CP (1999): Metalloprotease-disintegrin MDC9: intracellular maturation and catalytic activity. *J Biol Chem* **274**(6): 3531-3540

- Rosenberg C, Van Gorp RJ, Geelen E, Oosterhuis JW, Looijenga LH (2000): Overrepresentation of the short arm of chromosome 12 is related to invasive growth of human testicular seminomas and nonseminomas. *Oncogene* **19**(51): 5858-5862
- Rosewicz S, Wiedenmann B (1997): Pancreatic carcinoma. *Lancet* **349**(9050): 485-489
- 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 Biol* **6**(4): 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**(5): 541-569
- Rutz S, Scheffold A (2004): Towards in vivo application of RNA interference - new toys, old problems. *Arthritis Res Ther* **6**(2): 78-85
- Saitoh T, Mook-Jung I (1999): Is understanding the biological function of APP important in understanding Alzheimer's disease? *J Alzheimers Dis* **1**(4-5): 287-295
- 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**(4): 615-622
- Salmina K, Jankevics E, Huna A, Perminov D, Radovica I, Klymenko T, Ivanov A, Jascenko E, Scherthan H, Cragg M, Erenpreisa J (2010): Up-regulation of the embryonic self-renewal network through reversible polyploidy in irradiated p53-mutant tumour cells. *Exp Cell Res* **316**(13): 2099-2112
- Sandbrink R, Masters CL, Beyreuther K (1994): Similar alternative splicing of a non-homologous domain in beta A4-amyloid protein precursor-like proteins. *J Biol Chem* **269**(19): 14227-14234
- Sandbrink R, Monning U, Masters CL, Beyreuther K (1997): Expression of the APP gene family in brain cells, brain development and aging. *Gerontology* **43**(1-2): 119-131
- Santagata S, Ligon KL, Hornick JL (2007): Embryonic stem cell transcription factor signatures in the diagnosis of primary and metastatic germ cell tumors. *Am J Surg Pathol* **31**(6): 836-845
- Satoh M, Nakai A, Sokawa Y, Hirayoshi K, Nagata K (1993): Modulation of the phosphorylation of glucose-regulated protein, GRP78, by transformation and inhibition of glycosylation. *Exp Cell Res* **205**(1): 76-83
- Sayan BS, Yang AL, Conforti F, Bernardini S, Tucci P, Vasa-Nicotera M, Knight RA, Melino G (2010): Induction of TAp63 by histone deacetylase inhibitors. *Biochem Biophys Res Commun* **391**(4): 1748-1751
- Schmitz A, Tikkanen R, Kirfel G, Herzog V (2002): The biological role of the Alzheimer amyloid precursor protein in epithelial cells. *Histochem Cell Biol* **117**(2): 171-180

- Schubert D, Jin LW, Saitoh T, Cole G (1989): The regulation of amyloid beta protein precursor secretion and its modulatory role in cell adhesion. *Neuron* **3**(6): 689-694
- Schweyer S, Bachem A, Bremmer F, Steinfelder HJ, Soruri A, Wagner W, Pottek T, Thelen P, Hopker WW, Radzun HJ, Fayyazi A (2007): Expression and function of protein phosphatase PP2A in malignant testicular germ cell tumours. *J Pathol* **213**(1): 72-81
- Selkoe DJ (2001): Alzheimer's disease: genes, proteins, and therapy. *Physiol Rev* **81**(2): 741-766
- Sener SF, Fremgen A, Menck HR, Winchester DP (1999): Pancreatic cancer: a report of treatment and survival trends for 100,313 patients diagnosed from 1985-1995, using the National Cancer Database. *J Am Coll Surg* **189**(1): 1-7
- Serr F, Wiedmann M, Kamenz T, Tannapfel A, Mössner J, Hauss J, Caca K, Witzigmann H: Die Tyrosinkinase-Inhibitoren Imatinib (Glivec) und NVP-AEE788 und der mTOR-Inhibitor Sirolimus hemmen das Wachstum von Gallengangskarzinomen in vitro und in vivo, *Chirurgisches Forum* (III.): 49-51; Springer-Verlag GmbH, Heidelberg 2006
- Serrano J, Fernandez AP, Martinez-Murillo R, Martinez A (2010): High sensitivity to carcinogens in the brain of a mouse model of Alzheimer's disease. *Oncogene* **29**(15): 2165-2171
- Sidhu KS, Ryan JP, Tuch BE (2008): Derivation of a new human embryonic stem cell line, endeavour-1, and its clonal propagation. *Stem Cells Dev* **17**(1): 41-51
- Siemes C, Quast T, Klein E, Bieber T, Hooper NM, Herzog V (2004): Normalized proliferation of normal and psoriatic keratinocytes by suppression of sAPPalpha-release. *J Invest Dermatol* **123**(3): 556-563
- Simons A, Ruppert T, Schmidt C, Schlicksupp A, Pipkorn R, Reed J, Masters CL, White AR, Cappai R, Beyreuther K, Bayer TA, Multhaup G (2002): Evidence for a copper-binding superfamily of the amyloid precursor protein. *Biochemistry* **41**(30): 9310-9320
- Singhal N, Graumann J, Wu G, Arauzo-Bravo MJ, Han DW, Greber B, Gentile L, Mann M, Scholer HR (2010): Chromatin-Remodeling Components of the BAF Complex Facilitate Reprogramming. *Cell* **141**(6): 943-955
- Sisodia SS (1992): Beta-amyloid precursor protein cleavage by a membrane-bound protease. *Proc Natl Acad Sci U S A* **89**(13): 6075-6079
- Sisodia SS, Thinakaran G, Slunt HH, Kitt CA, Von Koch CS, Reed RR, Zheng H, Price DL (1996): Studies on the metabolism and biological function of APLP2. *Ann N Y Acad Sci* **777**: 77-81
- Skotheim RI, Lind GE, Monni O, Nesland JM, Abeler VM, Fossa SD, Duale N, Brunborg G, Kallioniemi O, Andrews PW, Lothe RA (2005): Differentiation of human embryonal carcinomas in vitro and in vivo reveals expression profiles relevant to normal development. *Cancer Res* **65**(13): 5588-5598

- Smith PK, Krohn RI, Hermanson GT, Mallia AK, Gartner FH, Provenzano MD, Fujimoto EK, Goeke NM, Olson BJ, Klenk DC (1985): Measurement of protein using bicinchoninic acid. *Anal Biochem* **150**(1): 76-85
- Soba P, Eggert S, Wagner K, Zentgraf H, Siehl K, Kreger S, Lower A, Langer A, Merdes G, Paro R, Masters CL, Muller U, Kins S, Beyreuther K (2005): Homo- and heterodimerization of APP family members promotes intercellular adhesion. *EMBO J* **24**(20): 3624-3634
- Sondag CM, Combs CK (2004): Amyloid precursor protein mediates proinflammatory activation of monocytic lineage cells. *J Biol Chem* **279**(14): 14456-14463
- Sonne SB, Perrett RM, Nielsen JE, Baxter MA, Kristensen DM, Leffers H, Hanley NA, Rajpert-De-Meyts E (2010): Analysis of SOX2 expression in developing human testis and germ cell neoplasia. *Int J Dev Biol* **54**(4): 755-760
- Sprecher CA, Grant FJ, Grimm G, O'Hara PJ, Norris F, Norris K, Foster DC (1993): Molecular cloning of the cDNA for a human amyloid precursor protein homolog: evidence for a multigene family. *Biochemistry* **32**(17): 4481-4486
- Stettner M, Kaulfuss S, Burfeind P, Schweyer S, Strauss A, Ringert RH, Thelen P (2007): The relevance of estrogen receptor-beta expression to the antiproliferative effects observed with histone deacetylase inhibitors and phytoestrogens in prostate cancer treatment. *Mol Cancer Ther* **6**(10): 2626-2633
- Sugiura K, Muro Y, Futamura K, Matsumoto K, Hashimoto N, Nishizawa Y, Nagasaka T, Saito H, Tomita Y, Usukura J (2009): The unfolded protein response is activated in differentiating epidermal keratinocytes. *J Invest Dermatol* **129**(9): 2126-2135
- Suzuki N, Cheung TT, Cai XD, Odaka A, Otvos L, Jr., Eckman C, Golde TE, Younkin SG (1994): An increased percentage of long amyloid beta protein secreted by familial amyloid beta protein precursor (beta APP717) mutants. *Science* **264**(5163): 1336-1340
- Takai N, Desmond JC, Kumagai T, Gui D, Said JW, Whittaker S, Miyakawa I, Koeffler HP (2004a): Histone deacetylase inhibitors have a profound antigrowth activity in endometrial cancer cells. *Clin Cancer Res* **10**(3): 1141-1149
- Takai N, Kawamata N, Gui D, Said JW, Miyakawa I, Koeffler HP (2004b): Human ovarian carcinoma cells: histone deacetylase inhibitors exhibit antiproliferative activity and potently induce apoptosis. *Cancer* **101**(12): 2760-2770
- 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**(1): 137-142
- Tamboli IY, Prager K, Barth E, Heneka M, Sandhoff K, Walter J (2005): Inhibition of glycosphingolipid biosynthesis reduces secretion of the beta-amyloid precursor protein and amyloid beta-peptide. *J Biol Chem* **280**(30): 28110-28117
- Tamura T, Cormier JH, Hebert DN (2008): Sweet bays of ERAD. *Trends Biochem Sci* **33**(7): 298-300

Tan MH, Nowak NJ, Loor R, Ochi H, Sandberg AA, Lopez C, Pickren JW, Berjian R, Douglass HO, Jr., Chu TM (1986): Characterization of a new primary human pancreatic tumor line. *Cancer Invest* **4**(1): 15-23

Tang CE, Guan YJ, Yi B, Li XH, Liang K, Zou HY, Yi H, Li MY, Zhang PF, Li C, Li JL, Peng F, Chen ZC, Yao KT, Xiao ZQ (2010): Identification of APP and cystatin C as novel EGFR-regulated secretory proteins in nasopharyngeal carcinoma by proteomics. *J Proteome Res*

Thinakaran G, Koo EH (2008): Amyloid precursor protein trafficking, processing, and function. *J Biol Chem* **283**(44): 29615-29619

Thinakaran G, Kitt CA, Roskams AJ, Slunt HH, Masliah E, von Koch C, Ginsberg SD, Ronnett GV, Reed RR, Price DL, et al. (1995): Distribution of an APP homolog, APLP2, in the mouse olfactory system: a potential role for APLP2 in axogenesis. *J Neurosci* **15**(10): 6314-6326

Tjio JH, Puck TT (1958): Genetics of somatic mammalian cells. II. Chromosomal constitution of cells in tissue culture. *J Exp Med* **108**(2): 259-268

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. Identification of intracellular compartments in which APP cleavage occurs without using toxic agents that interfere with protein metabolism. *J Biol Chem* **273**(11): 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**(9): 4350-4354

Uematsu K, Ogata S, Nakanishi K, Hiroi S, Tominaga S, Aida S, Kawai T (2010): Glucose-regulated protein 78 expression in urothelial carcinoma of the upper urinary tract. *BJU Int* **106**(6): 873-878

Uramoto H, Sugio K, Oyama T, Nakata S, Ono K, Yoshimastu T, Morita M, Yasumoto K (2005): Expression of endoplasmic reticulum molecular chaperone Grp78 in human lung cancer and its clinical significance. *Lung Cancer* **49**(1): 55-62

Van Lint C, Emiliani S, Verdin E (1996): The expression of a small fraction of cellular genes is changed in response to histone hyperacetylation. *Gene Expr* **5**(4-5): 245-253

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**(5440): 735-741

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**(14): 10678-10689

- Vetrivel KS, Thinakaran G (2006): Amyloidogenic processing of beta-amyloid precursor protein in intracellular compartments. *Neurology* **66**(2 Suppl 1): S69-73
- Villa A, Latasa MJ, Pascual A (2001): Nerve growth factor modulates the expression and secretion of beta-amyloid precursor protein through different mechanisms in PC12 cells. *J Neurochem* **77**(4): 1077-1084
- Villa A, Santiago J, Belandia B, Pascual A (2004): A response unit in the first exon of the beta-amyloid precursor protein gene containing thyroid hormone receptor and Sp1 binding sites mediates negative regulation by 3,5,3'-triiodothyronine. *Mol Endocrinol* **18**(4): 863-873
- Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AM, Bos JL (1988): Genetic alterations during colorectal-tumor development. *N Engl J Med* **319**(9): 525-532
- von Koch CS, Zheng H, Chen H, Trumbauer M, Thinakaran G, van der Ploeg LH, Price DL, Sisodia SS (1997): Generation of APLP2 KO mice and early postnatal lethality in APLP2/APP double KO mice. *Neurobiol Aging* **18**(6): 661-669
- Wada S, Morishima-Kawashima M, Qi Y, Misono H, Shimada Y, Ohno-Iwashita Y, Ihara Y (2003): Gamma-secretase activity is present in rafts but is not cholesterol-dependent. *Biochemistry* **42**(47): 13977-13986
- Walsh DM, Klyubin I, Shankar GM, Townsend M, Fadeeva JV, Betts V, Podlisny MB, Cleary JP, Ashe KH, Rowan MJ, Selkoe DJ (2005): The role of cell-derived oligomers of Abeta in Alzheimer's disease and avenues for therapeutic intervention. *Biochem Soc Trans* **33**(Pt 5): 1087-1090
- Walsh DM, Minogue AM, Sala Frigerio C, Fadeeva JV, Wasco W, Selkoe DJ (2007): The APP family of proteins: similarities and differences. *Biochem Soc Trans* **35**(Pt 2): 416-420
- Wang JF, Bown C, Young LT (1999): Differential display PCR reveals novel targets for the mood-stabilizing drug valproate including the molecular chaperone GRP78. *Mol Pharmacol* **55**(3): 521-527
- Wang Y, Ha Y (2004): The X-ray structure of an antiparallel dimer of the human amyloid precursor protein E2 domain. *Mol Cell* **15**(3): 343-353
- Warth R, Greger R (1993): The Ion Conductances of CFPAC-1 Cells. *Cell Physiol Biochem* **3**: 2-16
- Wasco W, Brook JD, Tanzi RE (1993a): The amyloid precursor-like protein (APLP) gene maps to the long arm of human chromosome 19. *Genomics* **15**(1): 237-239
- Wasco W, Gurubhagavatula S, Paradis MD, Romano DM, Sisodia SS, Hyman BT, Neve RL, Tanzi RE (1993b): Isolation and characterization of APLP2 encoding a homologue of the Alzheimer's associated amyloid beta protein precursor. *Nat Genet* **5**(1): 95-100
- Weggen S, Eriksen JL, Das P, Sagi SA, Wang R, Pietrzik CU, Findlay KA, Smith TE, Murphy MP, Bulter T, Kang DE, Marquez-Sterling N, Golde TE, Koo EH (2001): A subset of

NSAIDs lower amyloidogenic Abeta42 independently of cyclooxygenase activity. *Nature* **414**(6860): 212-216

Wehner S, Siemes C, Kirfel G, Herzog V (2004): Cytoprotective function of sAppalpha in human keratinocytes. *Eur J Cell Biol* **83**(11-12): 701-708

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**(1): 115-126

Wertkin AM, Turner RS, Pleasure SJ, Golde TE, Younkin SG, Trojanowski JQ, Lee VM (1993): Human neurons derived from a teratocarcinoma cell line express solely the 695-amino acid amyloid precursor protein and produce intracellular beta-amyloid or A4 peptides. *Proc Natl Acad Sci U S A* **90**(20): 9513-9517

Weskamp G, Cai H, Brodie TA, Higashiyama S, Manova K, Ludwig T, Blobel CP (2002): Mice lacking the metalloprotease-disintegrin MDC9 (ADAM9) have no evident major abnormalities during development or adult life. *Mol Cell Biol* **22**(5): 1537-1544

Weyer SW, Klevanski M, Delekate A, Voikar V, Aydin D, Hick M, Filippov M, Drost N, Schaller KL, Saar M, Vogt MA, Gass P, Samanta A, Jaschke A, Korte M, Wolfer DP, Caldwell JH, Müller UC (2011): APP and APLP2 are essential at PNS and CNS synapses for transmission, spatial learning and LTP. *EMBO J* **30**(11): 2306

Wiest DL, Burkhardt JK, Hester S, Hortsch M, Meyer DI, Argon Y (1990): Membrane biogenesis during B cell differentiation: most endoplasmic reticulum proteins are expressed coordinately. *J Cell Biol* **110**(5): 1501-1511

Wirhth O, Thelen KM, Lutjohann D, Falkai P, Bayer TA (2007): Altered cholesterol metabolism in APP695-transfected neuroblastoma cells. *Brain Res* **1152**: 209-214

Witt O, Deubzer HE, Milde T, Oehme I (2009): HDAC family: What are the cancer relevant targets? *Cancer Lett* **277**(1): 8-21

Woodward PJ, Heidenreich A, Looijenga H, Oosterhuis JW, McLeod DG, Møller H, Manivel JC, Mostofi FK, Heilemariam S, Parkinson MC, Grigor K, True L, Jacobsen GK, Oliver TD, Talerma A, Kaplan GW, Ulbright TM, Sestermenn IA, Rushton MG, Michael H, Reuter VE: World Health Organization Classification of Tumours. *Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs*: 217–278, IARC Press, Lyon 2004.

Wu J, Grunstein M (2000): 25 years after the nucleosome model: chromatin modifications. *Trends Biochem Sci* **25**(12): 619-623

Wu J, Kaufman RJ (2006): From acute ER stress to physiological roles of the Unfolded Protein Response. *Cell Death Differ* **13**(3): 374-384

Xia Q, Sung J, Chowdhury W, Chen CL, Hoti N, Shabbeer S, Carducci M, Rodriguez R (2006): Chronic administration of valproic acid inhibits prostate cancer cell growth in vitro and in vivo. *Cancer Res* **66**(14): 7237-7244

Yang Y, Turner RS, Gaut JR (1998): The chaperone BiP/GRP78 binds to amyloid precursor protein and decreases Abeta40 and Abeta42 secretion. *J Biol Chem* **273**(40): 25552-25555

Yasuoka K, Hirata K, Kuraoka A, He JW, Kawabuchi M (2004): Expression of amyloid precursor protein-like molecule in astroglial cells of the subventricular zone and rostral migratory stream of the adult rat forebrain. *J Anat* **205**(2): 135-146

Yonemura Y, Takamura H, Ninomiya I, Fushida S, Tsugawa K, Kaji M, Nakai Y, Ohoyama S, Yamaguchi A, Miyazaki I (1992): Interrelationship between transforming growth factor-alpha and epidermal growth factor receptor in advanced gastric cancer. *Oncology* **49**(2): 157-161

Yoshida M, Kijima M, Akita M, Beppu T (1990): Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. *J Biol Chem* **265**(28): 17174-17179

You JS, Kang JK, Seo DW, Park JH, Park JW, Lee JC, Jeon YJ, Cho EJ, Han JW (2009): Depletion of embryonic stem cell signature by histone deacetylase inhibitor in NCCIT cells: involvement of Nanog suppression. *Cancer Res* **69**(14): 5716-5725

Young-Pearse TL, Bai J, Chang R, Zheng JB, LoTurco JJ, Selkoe DJ (2007): A critical function for beta-amyloid precursor protein in neuronal migration revealed by in utero RNA interference. *J Neurosci* **27**(52): 14459-14469

Young-Pearse TL, Suth S, Luth ES, Sawa A, Selkoe DJ (2010): Biochemical and functional interaction of disrupted-in-schizophrenia 1 and amyloid precursor protein regulates neuronal migration during mammalian cortical development. *J Neurosci* **30**(31): 10431-10440

Zhang J, Herscovitz H (2003): Nascent lipidated apolipoprotein B is transported to the Golgi as an incompletely folded intermediate as probed by its association with network of endoplasmic reticulum molecular chaperones, GRP94, ERp72, BiP, calreticulin, and cyclophilin B. *J Biol Chem* **278**(9): 7459-7468

Zwang NA, Hoffert JD, Pisitkun T, Moeller HB, Fenton RA, Knepper MA (2009): Identification of phosphorylation-dependent binding partners of aquaporin-2 using protein mass spectrometry. *J Proteome Res* **8**(3): 1540-1554

## 8. Veröffentlichungen

Teile dieser Arbeit wurden bereits veröffentlicht:

### ❖ Publikation

**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**(14): 10678-10689

### ❖ Posterbeiträge

- 11/2010      *Society for Neuroscience satellite event 2010 – Update on Alzheimer Research*, San Diego; “The  $\beta$ -amyloid precursor Protein is a Potent Growth Factor – Implications for Cancer and Alzheimer’s disease.” **Venkataramani, V.**, Rossner C., Iffland L., Schweyer S., Irfan, T., Walter J., Wirths O. and Bayer TA.
- 03/2010      *4th NEURAD meeting at University of Amsterdam, Amsterdam*; “The  $\beta$ -amyloid precursor protein (APP) is a potent tumor growth factor.” **Venkataramani, V.**, Rossner C., Iffland L., Schweyer S., Irfan, T., Walter J., Wirths O. and Bayer TA.
- 03/2009      *9th International Conference AD/PD 2009, Prag*; “A simple cell culture system as new screening model in Alzheimer’s disease.” **Venkataramani V.**, Wirths O., Bayer TA
- 11/2008      *Alzheimer Workshop Society for Neuroscience 2008, Washington*; “Use of APP695 transfected Neuroblastoma cells as a screening-model in Alzheimer’s Disease?” **Venkataramani V.**, Wirths O., Bayer TA

### ❖ Vorträge

- 06/2011      *95. Jahrestagung der Deutschen Gesellschaft für Pathologie*, Leipzig; “Das Amyloid Vorläufer Protein (APP) ist ein potenter Wachstumsfaktor in Tumoren.” **Venkataramani V.**, Rossner C., Iffland L., Thiele K., Behnes C.-L., Wirths O., Bayer T.A., Schweyer S.

- 11/2010      *40<sup>th</sup> Meeting of the Society for Neuroscience 2010*,  
San Diego; “The Amyloid Precursor Protein Is a Potent Tumor Growth  
Factor.” **Venkataramani V.**, Schweyer, S, Bayer, T.A.
- 09/2009      *3rd NEURAD Summer School at University of Lille, Lille*; “The histone  
deacetylase inhibitor valproic acid blocks cancer proliferation via  
downregulation of the Alzheimer Amyloid Precursor protein.”  
**Venkataramani V.**, Rossner C., Wirths O. and Bayer TA

❖ Auszeichnungen

- 11/2010      *3. Posterpreis Society for Neuroscience satellite event 2010 – Update on  
Alzheimer Research*, San Diego;  
Posterpräsentation: “The  $\beta$ -amyloid precursor Protein is a Potent Growth  
Factor – Implications for Cancer and Alzheimer’s disease.”  
**Venkataramani, V.**, Rossner C., Iffland L., Schweyer S., Irfan, T., Walter  
J., Wirths O. and Bayer TA.

## **Danksagung**

Mein besonderer Dank gilt Prof. Thomas A. Bayer, der mir die Möglichkeit gab, diese Arbeit in seinem Labor durchzuführen und der an mich und an das Projekt geglaubt hat. Ebenfalls danke ich ihm für die vielen wertvollen Anregungen, für die Betreuung und die Gelegenheit zur Teilnahme an nationalen und internationalen Konferenzen. Weiterhin möchte ich mich herzlich bei Dr. Oliver Wirths bedanken, der mich ebenfalls tagtäglich ermutigt und unterstützt hat.

Ein besonderer Dank gilt auch PD Dr. Stefan Schweyer für die Möglichkeiten, in seinem Labor zu arbeiten, für seine umfassende Unterstützung und die gute Zusammenarbeit. Auch möchte ich mich bei PD Dr. Paul Thelen für die zahlreichen Diskussionen und die Unterstützung bedanken.

Bedanken möchte ich mich auch bei allen Mitgliedern der Arbeitsgruppe von Prof. Bayer für die gute Stimmung, für die Hilfsbereitschaft und viele anregende Diskussionen.