

Aus dem Institut für Pathologie
(Prof. Dr. med. H.J. Radzun)
im Zentrum Pathologie und Rechtsmedizin
der Medizinischen Fakultät der Universität Göttingen

**Die Wirkung des Histondeacetylase-Inhibitors
Valproinsäure auf Keimzelltumoren des Hodens**

INAUGURAL-DISSERTATION

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

vorgelegt von
Knut Thiele
aus
Heide

Göttingen 2014

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

1. Berichterstatter: PD Dr. med. S. Schweyer

2. Berichterstatter/in: Prof. Dr. Holger Dirk Bastians

3. Berichterstatter/in: Prof. Dr. Heidi Eva Hahn

Tag der mündlichen Prüfung: 29.07.2014

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1	Einleitung	1
1.1	<i>Maligne Keimzelltumoren des Hodens</i>	1
1.1.1	Epidemiologie und Ätiologie.....	1
1.1.1.1	Das Tumorstammzellmodell.....	3
1.1.2	Klassifikation der testikulären Keimzelltumoren.....	4
1.1.2.1	Chromosomale und molekulare Eigenschaften: IGCNU, Seminome und EC ...	6
1.1.3	Klinik, Diagnose und Therapie der malignen Keimzelltumoren des Hodens	8
1.2	<i>Valproinsäure (VPA)</i>	10
1.3	<i>Histondeacetylasen (HDACs)</i>	11
1.4	<i>Histondeacetylase-Inhibitoren (HDACi)</i>	13
1.5	<i>Zielsetzung</i>	14
2	Material und Methoden	15
2.1	<i>Material</i>	15
2.1.1	Chemikalien und biochemische Agenzien.....	15
2.1.2	Gebrauchsmaterialien.....	17
2.1.3	Technische Geräte.....	17
2.1.4	Tiere.....	18
2.2	<i>Methoden</i>	18
2.2.1	Valproinsäure.....	18
2.2.2	Zellkultur.....	19
2.2.2.1	NTERA-2-Zelllinie.....	19
2.2.2.2	TCam-2-Zelllinie.....	20
2.2.3	Tierversuch.....	20
2.2.3.1	Versuchsaufbau.....	20
2.2.3.2	Versuchstiere.....	21
2.2.4	Morphologie (Cytospins).....	22
2.2.5	Mikroarray-Expressionsanalyse.....	22
2.2.6	Nukleinsäureanalytik.....	25
2.2.6.1	RNA-Isolierung.....	25
2.2.6.2	Reverse-Transkription (RT).....	25
2.2.6.3	Quantitative-real-time-PCR (q-RT-PCR).....	26
2.2.7	Proliferationsassay.....	28
2.2.8	Protein-Analytik.....	28
2.2.8.1	Protein-Extraktion.....	28
2.2.8.2	Westernblot.....	29
2.2.8.3	Wiederaufbereitung der Membran.....	30
2.3	<i>Statistisches Prozedere</i>	31

3	Ergebnisse	32
3.1	<i>Valproinsäure hemmt das Tumorwachstum im TGCT- Mausmodell.....</i>	32
3.2	<i>VPA-Wirkung auf Histonprotein-H3.....</i>	33
3.3	<i>Mikroarray-Expressionsanalyse</i>	34
3.4	<i>Mikroarray-Evaluation mittels q-RT-PCR</i>	34
3.5	<i>VPA und Proliferation in TGCT</i>	35
3.6	<i>VPA-induzierte Apoptose in TGCT.....</i>	38
3.7	<i>VPA induziert Differenzierung und verändert das Stammzellgenmuster in TGCT</i>	39
4	Diskussion	42
4.1	<i>Die Wirkung von VPA auf TGCT in-vivo im Vergleich zu anderen soliden Tumorentitäten</i>	42
4.2	<i>VPA-induzierte Hyperacetylierung von Histonproteinen in TGCT</i>	45
4.3	<i>VPA und Proliferation in TGCT.....</i>	45
4.4	<i>VPA und Apoptose in TGCT.....</i>	48
4.5	<i>VPA induziert Differenzierung und verändert das Stammzellgenmuster in TGCT.....</i>	49
5	Zusammenfassung.....	56
	Literaturverzeichnis.....	58

Abkürzungsverzeichnis

ADRB2	β -2-Adrenozeptor
AFP	α -Fetoprotein
AK	Antikörper
ANGPTL4	Angiopietin-like 4
AP	Alkalische Phosphatase
AP2 γ	Alkalische Phosphatase-2 γ
ARP	Arginine-rich Protein
ARR2D4	Arrestin domain containing 4
BCAT1	Branched chain amino-acid transaminase 1
BCLxL	BCL2-like 1
β -hCG	β -Untereinheit humanes Choriongonadotropin
BMP6	Bone morphogenetic protein 6
bp	Basenpaare
BRAF	V-raf murine sarcoma viral oncogene homolog B1
BSA	Rinderserumalbumin
CASP-8	Caspase-8
CDC-2/CDK-1	Cyklin-abhängige Kinase 1
CDK-2	Cyklin-abhängige Kinase 2
CDK-4	Cyklin-abhängige Kinase 4
CFLAR	CASP8 und FADD-like apoptosis regulator
c-Myc	V-myc myelocytomatosis viral oncogene homolog
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
Da	Dalton
DAB	3-3'Diaminobenzidine
DEPC	Diethylpyrocarbonat
DNA	Desoxyribunukleinsäure
dNTP	Desoxynukleosidtriphosphat
EC	Embryonales Karzinom
EDTA	Ethylendiamintetraacetat (Dinatriumsalz)
EGF	Epidermal growth factor
EGR2	Early growth response 2
FADD	Fas (TNFRSF6)-associated via death domain
FAP	Familiäre adenomatöse Polyposis Coli
FCS	Fetales Kälberserum
FGF2	Fibroblast growth factor 2
FGF4	Fibroblast growth factor 4
FGF9	Fibroblast growth factor 9
FGF23	Fibroblast growth factor 23
<i>g</i>	Gravitation 9,81m/s ²
Gadd 45 A	Growth arrest and DNA damage 45 A
Gadd 45 B	Growth arrest and DNA damage 45 A
GATA6	GATA binding protein 6
GDF3	Growth differentiation factor 3

GEKID	Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister
h	Stunde
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC(s)	Histondeacetylase(n)
HDACi	Histondeacetylase Inhibitor
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazine-N'-2-Ethanesulfonic acid
HLADRB5	Humanes Leukozytenantigen, class II, DR beta 5
HMGA2	High mobility group AT-hook 2
HOPE	Hepes glutamic acid buffer mediated organic solvent protection effect
HRP	Horseradish-Peroxidase
IGCCCG	International Germ Cell Cancer Cooperative Group
IGCNU	Intratubular germ cell neoplasia of unclassified type
IGF2	Insulin-like-growth-factor 2
IGF2BP1	Insulin-like-growth-factor 2-mRNA-binding-Protein1
IGFBP3	Insulin-like-growth-factor-binding-Protein3
IU	International Unit = internationale Einheit
k	Kilo (10^3)
kb	Kilobasen (1000bp)
l	Liter
LDH	Laktatdehydrogenase
LIF	Leukemia inhibitory Faktor
LIN28	Lin-28 homolog A
μ	mikro (10^{-6})
μ g	Mikrogramm
m	milli (10^{-3})
M	Molar
ml	Milliliter
mg	Milligramm
mol	Mol ($6,23 \times 10^{23}$ Teilchen)
N	Rotationsgeschwindigkeit
NANOG	Nanog homeobox
NGFR	Nerve growth factor receptor
NSCLC	Nicht-kleinzelliges-Lungenkarzinom
Oct-3/4 (POU5F1)	POU class 5 homeobox 1
PCR	Polymerase-Kettenreaktion
PDGF	Platelet derived growth Faktor
PDGFA	Platelet-derived growth factor alpha
PDGFC	Platelet derived growth factor C
PDPN	Podoplanin
p16INK4a/CDKN2A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A
PML	Promyelozytenleukämie
PODXL	Podocalyxin-like
PPAP2B	Phosphatidic acid phosphatase type 2B
p21WAF1/CDKN1A	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1
q-RT-PCR	Quantitative real-time-PCR

r	Radius
RCF	Relative centrifugal force $RCF = r(2\pi N)^2/g$
RKI	Robert-Koch-Institut
RLA	Retroperitoneale Lymphadenektomie
RNA	Ribonukleinsäure
RNAse	Ribonuklease
RT	Reverse Transkription
Saha	Suberoylanilide hydroxamic Acid
s.c.	Subkutan
SDS	Sodiumdodecylsulfat
SMAD1	Mothers against decapentaplegic homolog 1
SOX2	SRY (sex determining region Y)-box 2
SOX3	SRY (sex determining region Y)-box 3
SOX17	SRY (sex determining region Y)-box 17
SSPE	Sodium chloride dihydrogen phosphate (Natrium-Chlorid-Dihydrogenphosphat)
TBS	Tris-HCl-gepufferte Saline
TBST	Tris-HCl-gepufferte Saline mit Tween
TDGF1	Teratocarcinoma-derived growth factor 1
TEAD1	TEA domain family member 1 (SV40 transcriptional enhancer factor)
TGCT	Testikuläre Keimzelltumoren
TNFRSF6(FAS)	Tumor necrosis factor receptor superfamily member 6
TNFSF9	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 9
TP53	Tumor Protein 53
TRAIL/ APO2L	Tumornekrosefaktor (Ligand) Superfamilie, Mitglied 10
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Aminomethan
U	Unit: Enzymeinheit, die 1 μ mol Substrat/min umsetzt
VDR	Vitamin-D-Rezeptor
VPA	Valproinsäure
VPM	Valpromide
WB	Westernblot
WNT	Wingless/int
YAP1	Yes-associated protein 1

1 Einleitung

1.1 Maligne Keimzelltumoren des Hodens

1.1.1 Epidemiologie und Ätiologie

In Deutschland erkranken derzeit jährlich ungefähr 4750 Männer (10 Erkrankungen/100000 männliche Einwohner/Jahr) an malignen Hodentumoren (RKI und GEKID 2008). Sie bilden mit 2% der Gesamtzahl maligner Erkrankungen des Mannes eine eher seltene Tumorentität und verursachen nur 0,2% aller Krebssterbefälle bei Männern (RKI und GEKID 2008). Besondere Relevanz erlangen die Hodentumoren jedoch durch ihren frühen Krankheitsbeginn und die damit verbundenen sozialen und psychologischen Auswirkungen (Familie, Beruf, Sexualität, Fertilität) (Diekmann und Huland 2001).

Mit 95% stellen die testikulären Keimzelltumoren (TGCT) den größten Anteil der Hodentumoren (Mikuz 2008). Sie sind die häufigsten bösartigen Neoplasien junger Männer zwischen dem 15. und 34. Lebensjahr (Buetow 1995). Hierbei werden nach der histologischen Unterscheidung zwei Altersgipfel, für Seminome zwischen dem 30. und 40. Lebensjahr und für nicht-seminomatöse Keimzelltumoren zwischen dem 20. und 30. Lebensjahr, beschrieben (**Abb. 1**) (Mikuz 2008).

Neuerkrankungen pro 100.000 in Altersgruppen

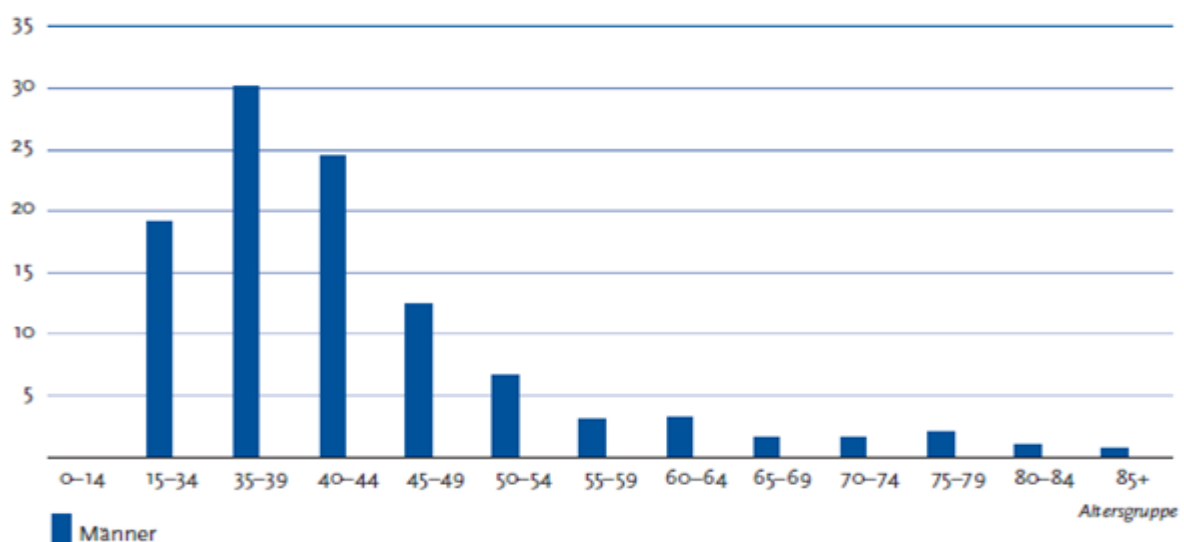


Abbildung 1: Schätzung der altersspezifischen Inzidenz von TGCT in Deutschland 2004 (RKI und GEKID 2008,S.75)

Weltweit ist seit Mitte des zwanzigsten Jahrhunderts ein Inzidenzanstieg von TGCT zu verzeichnen (Bergstrom et al. 1996; McGlynn et al. 2003). Dieser Anstieg war besonders bei der weißen Bevölkerung Europas oder Nachfahren europäischer Emigranten zu verzeichnen (**Abb.2**) (Jack et al. 2007; McGlynn et al. 2003). Es ist jedoch im Allgemeinen ein Anstieg der Inzidenz, auch bei Menschen anderer ethnischer Gruppierungen, zu beobachten (McGlynn et al. 2005; Shah et al. 2007; Walsh et al. 2008).

Altersstandardisierte Neuerkrankungen pro 100.000 (Weltstandard)
 Quelle: Globocan-Schätzung 2002, RKI-Schätzungen für Deutschland 2002 und 2004

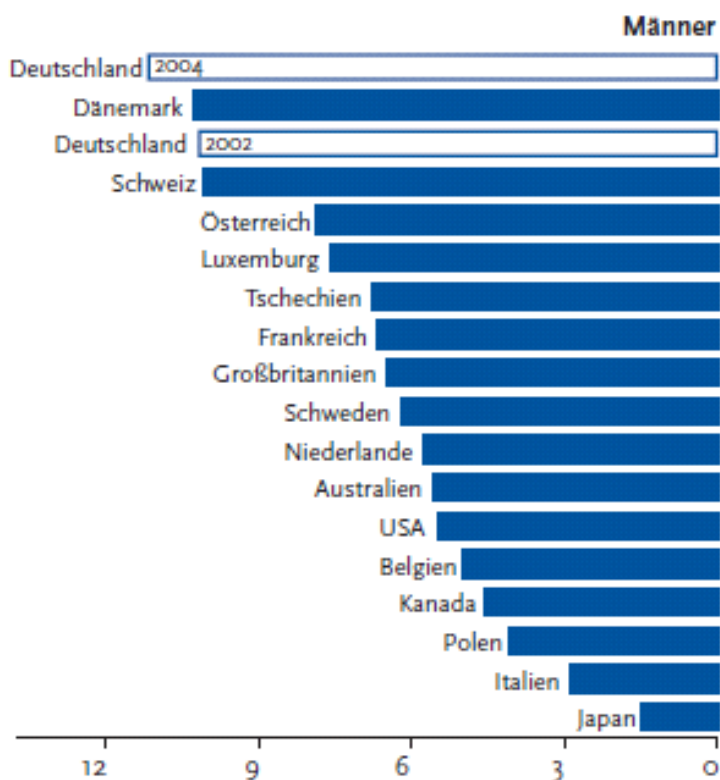


Abbildung 2: Neuerkrankungen in Deutschland 2002 und 2004 nach RKI-Schätzung 1980-2002 und 1980-2004 im internationalen Vergleich (RKI und GEKID 2008, S.75)

Als Entstehungsursachen der TGCT werden allgemein Störungen angenommen, die früh in der Reifung und Differenzierung der Keimzellen liegen. Unter anderem wird ein mögliches Vorliegen von gestörten Keimzellen bereits in der Fetalperiode vermutet (Skakkebaek et al. 1987). Hieraus könnte eine Entwicklung der Malignome unter Änderung der Homöostase der primordialis Keimzellnische durch endo- oder exogene Faktoren, beispielsweise durch hormonellen Einfluss von Östrogenen in der Pubertät, resultieren (Looijenga et al. 2007). Als gesicherte Risikofaktoren gelten

zum einen genetische Faktoren, wie durch ein vermehrtes familiäres Auftreten zu vermuten ist, sowie die Entwicklung eines TGCT im kontralateralen Hoden. Hierbei sind die genauen Veränderungen allerdings noch unbekannt. Zum anderen wurden verschiedene Umweltfaktoren unter dem Namen testikuläres Dysgenese-Syndrom (TDS) zusammengefasst (Skakkebaek et al. 2001; Skakkebaek 2003; Sonne et al. 2008). Das TDS besagt, dass aufgrund von Umweltfaktoren mit antiandrogenen und/oder östrogenähnlichen Eigenschaften Störungen entstehen, die die physiologische Entwicklung des Hodens (Leydig- und Sertoli-Zellen inbegriffen) negativ beeinflussen können. Dies kann die Entstehung eines Maldescensus testis (Kryptorchismus), einer Hypospadie und Infertilität fördern. Darüber hinaus kann es bei der Progression eines TDS zur Entstehung maligner Keimzelltumoren des Hodens kommen (Looijenga et al. 2011).

1.1.1.1 Das Tumorstammzellmodell

Der genaue Mechanismus der Entstehung von soliden Tumoren ist immer noch Gegenstand der Forschung und Thema vieler Diskussionen. Neben dem Modell, dass eine reife Zelle unterschiedlichen genetischen Veränderungen unterliegt, wurde das Tumorstammzellmodell erneut etabliert, wobei sich die beiden Modelle nicht widersprechen müssen (Looijenga et al. 2007; Polyak und Hahn 2006).

Als Tumorstammzellen werden sich selbst erhaltende Zellen definiert, welche die Möglichkeit besitzen, einen in der Zusammensetzung heterogenen Tumor zu generieren. Der genaue Unterschied zwischen Tumorstammzellen und normalen Stammzellen ist noch nicht genau bestimmt, und es ist weiterhin möglich, dass Tumorstammzellen lediglich Stammzellphänotypen nachahmen oder die Form einer veränderten Übergangszelle annehmen (Passegue et al. 2003; Polyak und Hahn 2006; Smalley und Ashworth 2003). Die Tumorstammzellen teilen sich selten und bei der Teilung entstehen zwei ungleiche Zellklone, eine weiterhin pluripotente und eine in der Differenzierung und/oder Transformation fortgeschrittene Zelle (Übergangszelle) (Smalley und Ashworth 2003; Trounson 2004).

Wie für embryonale Stammzellen bekannt, nimmt man auch für die Tumorstammzellen an, dass sie in einer spezifischen Nische existieren und dort der Regulation des vorhandenen Milieus unterliegen, genauer gesagt, dass sich die maligne Zelle und das Milieu gegenseitig beeinflussen. So vermutet man, dass manche Zellklone

abhängig von dem durch die malignen Zellen geschaffenen Milieu sind (Looijenga et al. 2007; Weinstein 2002).

Solche Tumorstammzellen konnten für AML (akute myeloische Leukämie) oder maligne Erkrankungen der Brust, der Lunge, des Pankreas, der Prostata, der Ovarien und in Glioblastomen nachgewiesen werden (Bapat et al. 2005; Dick 2005; Huss et al. 2004; Kim et al. 2005; Li C et al. 2007; Ponti et al. 2005; Shackleton et al. 2006; Singh et al. 2003). Im Tierversuch entstanden aus einer sehr kleinen Anzahl von injizierten Tumorstammzellen (n=200) vollständige Tumoren, während mit der Injektion von reiferen Tumorzellen nur durch die Verwendung einer wesentlich größeren Anzahl von Zellen (n=50000) ein ähnliches Ergebnis erzielt werden konnte (Al-Hajj et al. 2003). Weiterhin wird diskutiert, ob diese Zellen malignen Klonen entsprechen, welche direkt aus der inneren Zellmasse entstammen und aus diesem Grund Stammzeleigenschaften besitzen, oder ob reife maligne Zellen Stammzeleigenschaften wiedererwerben (Looijenga et al. 2007).

Dass aus Stammzellen maligne Erkrankungen entstehen können, zeigt sich an einer Vielzahl von hämatologischen Erkrankungen. Hier finden sich häufig maligne Klone aus Vorläuferzellen der jeweiligen myeloischen Zellreihe. Ebenso kann man in diesem Kontext die TGCT nennen. So ist eine Seminom-Zelle als maligner Gegenpart einer primordialis Keimzelle zu betrachten und eine EC-Zelle entspricht der malignen Variante einer pluripotenten Zelle der inneren Zellmasse (Looijenga et al. 2007).

1.1.2 Klassifikation der testikulären Keimzelltumoren

Nach therapeutischen und histogenetischen Kriterien werden die TGCT in Seminome und Nicht-Seminome unterteilt. Nicht-Seminome können dem Differenzierungsgrad nach in embryonalen Stammzellen ähnelnde, undifferenzierte embryonale Karzinome (EC), differenzierte (reife oder unreife) Teratome sowie in extra-embryonales Gewebe differenzierte Chorion- und Dottersacktumore aufgeteilt werden. Es können auch Mischformen vorkommen. Ihren Ursprung nehmen Seminome und Nicht-Seminome aus der „Intratubulären Keimzellneoplasie vom unklassifizierten Typ“ (IGCNU), wobei das spermatozytische Seminom als Untergruppe der Seminome eine Ausnahme darstellt.

Eine genauere histologische Betrachtung unterteilt die Seminome in drei Gruppen: Das klassische Seminom, das Seminom mit synzytiotrophoblastären Riesenzellen

und das spermatozytische Seminom. Die Tumorzellen des klassischen Seminoms sind groß, rund und weisen ein glykogenreiches, helles Plasma auf, in dem hyperchromatische Zellkerne mit deutlichen Nukleolen liegen, die charakteristischerweise in Gruppen angeordnet und von Bindegewebssepten umgeben sind. Seminome mit trophoblastären Riesenzellen besitzen typischerweise β -hCG-produzierende synzytiotrophoblastäre Riesenzellen, die zu einer Erhöhung von β -hCG im Serum auch bei Seminomen führen können. Die Nicht-Seminome werden im Folgenden ebenfalls genauer histologisch beschrieben: Beim EC ahmen die Tumorzellen entdifferenzierte Epithelien nach. Die deutlich seltener vorkommenden Teratome zeigen mikroskopisch Gewebsabkömmlinge aller drei Keimblätter, wobei typischerweise epitheliale Zysten, Hautanhangsgebilde, Muskeln, Knorpel und Knochen sowie Darm und Bronchialschleimhaut zu beobachten sind. Dottersacktumoren treten zumeist (75%) bei Kleinkindern auf und machen nur 2 % aller Keimzelltumoren aus. Mikroskopisch zeigen die Tumorzellformationen in der Regel mikrozystische Areale unter Ausbildung so genannter Schiller-Duval-Körperchen. Die Dottersacktumoren weisen immunhistochemisch eine Expression von α -Fetoprotein (AFP) auf. AFP wird von den Tumorzellen sezerniert und lässt sich als Tumormarker im Serum bei TGCT mit Dottersacktumoranteilen nachweisen (Mikuz 2008). Das Chorionkarzinom ist der seltenste TGCT, der Plazentagewebe nachahmt und aus trophoblastären und synzytiotrophoblastären Tumorzellen besteht. Die Tumorzellen besitzen immunhistochemisch eine Expression des β -HCG, welches sezerniert wird und dann im Blut als Tumormarker bei TGCT bestimmt werden kann.

Nach der modifizierten WHO-Klassifikation von Looijenga zählt man maligne Keimzelltumoren des Hodens (Seminome und Nicht-Seminome) zu den TYP-II-TGCT. Diese Unterteilung basiert auf der Berücksichtigung der Tumorlokalisation, dem Alter des Patienten, der histologischen Zusammensetzung, dem Muster des genomischen Imprintings, der molekularen Markerexpression und der chromosomalen Konstitution (Looijenga 2009). Es werden hiernach fünf Typen von Keimzelltumoren unterschieden (**Tab. 1**).

Typ	Ursprungszelle	Histologie	Marker für die Diagnose							
I	Embryonale Keimzelle (jedoch nicht identifiziert) OCT3/4+/CD30-	(Unreifes) Teratom und/oder Dottersacktumor	Zytokeratin AFP							
			OCT3/4 NANOG	PLAP c-Kit AP-2 γ	SOX2	SOX17	CD30	AFP	hCG	Cytokine
II	Maligne primordiale Keimzelle/ Gonozyt = Carcinoma in situ (CIS)	Seminom (und CIS)	+	+(/-)	-	+	-	-	-	+/- (-)
		Nichtseminom: -Embryonalkarzinom	+	-/+	+	-	+/-	-	-	+
		-Dottersacktumor	-	-	-	-	-	+/-	-	+
		-Chorionkarzinom	-	-	-	-	-	-	+	+
		-Teratom	-	-	+/-	+/-	-	-	-	+
III	Spermatogonie/Spermatozyt = intratubuläres spermatozytisches Seminom	Spermatozytisches Seminom	SSX, SCP1, XPA, DMRT1, Chk2, p53, p19INK4D, MAGE-A4,							
IV	Oogonie/Oozyt	Dermoidzyste	Histologie							
V	Windei/Spermatozoen	Blasenmole	Histologie							

+ Homogene positive Färbung; +(/-) vorherrschend positive Färbung; +/- mögliche heterogene Färbung; -/+ mögliche sporadische positive Zellen; - negativ.

Tabelle 1: Typ I-V-TGCT; modifizierte WHO-Klassifikation gemäß Looijenga (2009); S.352.

1.1.2.1 Chromosomale und molekulare Eigenschaften: IGCNU, Seminome und EC

Die IGCNU repräsentiert die nicht-invasive Vorläuferläsion der Typ-II-TGCT und als nicht-invasives Korrelat des Carcinoma in situ anderer Tumorentitäten (Loy und Dieckmann 1990; Looijenga 2009). Die IGCNU ist in den präexistenten Hodentubuli lokalisiert und wird von einer intakten Basalmembran der Tubuli seminiferi in Nachbarschaft der Sertoli-Zellen umgeben. Sie werden wie die reifenden Keimzellen vom Mikromilieu der Keimzellnische beeinflusst. Die IGCNU-Zellen zeigen ähnlich wie Seminom-Zellen eine deutliche Übereinstimmung mit Gonozyten/primordialen Keimzellen; dies betrifft sowohl die Morphologie, als auch das nicht vorhandene klassische genomische Imprinting, die Telomeraseaktivität und die hypomethylierte epigenetische Konstitution (Albanell et al. 1999; Gondos 1993; Looijenga et al. 1998; Looijenga 2008; Netto et al. 2008; Van Gorp et al. 1994). Hervorzuheben ist die Expression von Genen, welche normalerweise dem Expressionsmuster embryonaler Stammzellen entsprechen würden (Looijenga 2009). Gene wie AP, OCT-3/4, NANOG, AP2- γ , UTF1 und andere finden sich in gleicher Weise in erwachsenen Keimzelltumoren (Oosterhuis und Looijenga 2005; Rajpert-De Meyts 2006).

In der IGCNU werden wichtige Schritte zur somatischen Differenzierung über unterschiedliche Mechanismen inhibiert. Aus diesem Grund wurden sie auch als in der Reifung geblockte Keimzellen bezeichnet (Honecker et al. 2004). Genexpressionsprofile legten nahe, dass die IGCNU embryonale Stammzellen imitieren, was diese

Zellen von anderen erwachsenen Stammzellen unterscheidet, welche in spermatogenetischen Keimzelllinien identifiziert wurden (Almstrup et al. 2005; de Roij und Mizrak 2008).

Mit Übergang der IGCNU in invasive TGCT kommt es zu einer für TGCT typischen strukturellen Änderung des Chromosoms 12. Dort lässt sich in 80% ein Isochromosom 12 (i(12p)) nachweisen. Die Verdopplung des kurzen Armes des Chromosoms 12 ist uniparenteral (Geurts vK et al. 1993). Auch wenn verschiedene Thesen zur Bedeutung dieser Veränderung existieren, so ist die genaue pathogenetische Bedeutung noch nicht geklärt (Looijenga 2009).

Seminom-Zellen unterscheiden sich von IGCNU-Zellen durch ihr invasives Wachstum (Looijenga et al. 2007). Bei der Entstehung eines EC findet eine genetische Reprogrammierung einer neoplastischen veränderten primordialen Keimzelle zu einer pluripotenten EC-Zelle statt (Looijenga 2009). Hierbei werden Veränderungen des epigenetischen Musters (siehe unten) und eine differentielle Genexpression beobachtet (Looijenga 2009). Dabei spielen, neben der klassischen, klinischen Unterscheidung zwischen Seminom und EC, weitere Markergene eine immer größere Rolle (Horwich et al. 2006; Looijenga 2009). So exprimieren IGCNU/Seminome und EC unter anderem die Stammzellmarker NANOG und OCT-3/4 (POU5F1). In EC findet man im Gegensatz zum Seminom OCT-3/4 auch im Zytoplasma lokalisiert (de Jong et al. 2005). Des Weiteren scheinen in der Tumorbilogie der TGCT Gene der „sex determining region Y (SRY)- box“-Gruppe eine wichtige Rolle zu spielen. EC exprimieren das Gen SOX2. Die Expression von NANOG, OCT-3/4 in Kombination mit SOX2 definiert den Phänotyp EC (**Tab.1**) (Looijenga 2009). Diese drei Faktoren sind als sogenannte „Masterregulatoren der Pluripotenz“ entscheidend an der Aufrechterhaltung der pluripotenten Eigenschaften in embryonalen Stammzellen und EC-Zellen beteiligt (Boyer et al. 2005; Looijenga 2009).

Seminom-Zellen zeigen keine SOX2-Expression. In ihnen interagieren OCT-3/4 und NANOG mit einem anderen Vertreter der „sex determining region Y (SRY)- box“-Gruppe, SOX17 (**Tab.1**) (Looijenga 2009). Trotz der aufgeführten spezifischen Expressionsmuster sind die genauen Mechanismen, die zur Umwandlung der IGCNU/Seminomzellen und zur Aktivierung der Pluripotenz in EC führen, noch unbekannt (Looijenga 2007). Wie bereits erwähnt, wird in diesem Kontext die Bedeutung von epigenetischen Veränderungen, insbesondere der DNA-Methylierung diskutiert.

Seminome besitzen größtenteils keine DNA-Methylierung, während EC eher ein DNA-Methylierungsmuster konkordant zu anderen Tumoren zeigen. Generell scheint der Methylierungsgrad mit dem Differenzierungsgrad zuzunehmen. Die wenig differenzierten pluripotenten EC zeigen kaum DNA-Methylierung, während die gut differenzierten Teratome die stärkste Methylierung zeigen (Lind et al. 2007). Auf die genaue Bedeutung und die Mechanismen der DNA-Methylierung soll hier nicht näher eingegangen werden.

1.1.3 Klinik, Diagnose und Therapie der malignen Keimzelltumoren des Hodens

Klinisch imponieren die TGCT häufig als schmerzlose Schwellung des Hodens, wobei ein harter Palpationsbefund erhoben werden kann. Gemäß der "Leitlinie zur Diagnostik und Therapie von Hodentumoren auf der Grundlage evidenzbasierter Medizin (EBM)" (2002) kann die Diagnose eines Hodentumors durch klinischen Befund, Sonographie, Bestimmung der Tumormarker sowie klinisch-chemischen Parametern (AFP, β -hCG, LDH) gestellt werden (Albers et al. 2011). Die Tumoren werden gemäß der Klassifikation nach Lugano drei Stadien zugeordnet. Bei dieser Einteilung werden die Ausbreitung des Tumors, der Lymphknotenbefall und der Metastasierungsgrad berücksichtigt. Zudem werden die Tumoren abhängig von der IGCCCG (International Germ Cell Cancer Cooperative Group)-Klassifikation in drei Prognosegruppen (Günstige, intermediäre, ungünstige Prognose) eingestuft. Hierbei wird die Unterscheidung Seminom, Nicht-Seminom, die Konstellation der Tumormarker, die Lokalisation von Metastasen und die Lokalisation des Primarius betrachtet. Aus der Zusammenführung beider Klassifikationen wird die Entscheidung zu Gunsten einer Therapiestrategie getroffen. Hierbei steht bei der Therapie von Hodentumoren die chirurgische Intervention an erster Stelle.

Die weitere Behandlung erfolgt gemäß den Leitlinien zur stadiengerechten Therapie von Hodentumoren (**Tab. 2**).

Neben der Orchiektomie kommen die Verfahren der Radio/Chemotherapie zum Einsatz. Zum größten Teil zeigen Typ-II-TGCT eine gute Ansprechbarkeit auf Chemotherapeutika (Masters und Koberle 2003).

Stadium	Therapie
Seminom Stadium I	-prophylaktische Radiatio des Retroperitoneums mit einer Dosis von 20 Gy -Surveillance (bei guter Patientencompliance) -Carboplatin-Mono-Chemotherapie (AUC 7)
Nichtseminom Stadium I Klinisches Stadium Ia (pT1,keine Gefäßinvasion) Klinisches Stadium Ib (pT2-pT4),Gefäßinvasion	-Surveillance (bei guter Patientencompliance) -Chemotherapie mit 2 Kursen PEB -Primäre RLA(bei positiven Lymphknoten -> 2 Kurse adjuvante Chemotherapie PEB) Primär adjuvante Chemotherapie mit 2 Kursen PEB -primär RLA bei fehlender Patientencompliance mit einer Rezidivwahrscheinlichkeit von 50%
Metastatische Hodentumoren	
Seminom Stadium IIa Seminom Stadium IIb Seminom Stadium IIc	-Retroperitoneale Radiatio mit 30 Gy -Retroperitoneale Radiatio mit 36 Gy oder Chemotherapie mit 3 Kursen PEB -Chemotherapie mit 3 Kursen PEB
Nichtseminom Stadium II mit erhöhten Tumormarkern Nichtseminom Stadium mit niedriger Tumorlast und normalen Tumormarkern	-Adjuvante Chemotherapie mit 3 Kursen PEB,-> bei Residual- tumormasse von >1 cm RLA mit Residual-tumorresektion -primäre RLA oder adjuvante Chemotherapie mit 3 Kursen PEB-> bei Residualtumormasse von >1cm RLA mit Residualtumorresektion
Nichtseminom intermediäre und schlechte Prognosegruppe	-Adjuvante Chemotherapie mit 4 Kursen PEB -> bei Residualtumormasse von >1cm RLA mit Residualtumorresektion
Legende: PEB- Polychemotherapie nach dem Schema Cisplatin, Etoposid und Bleomycin, Stadien angelehnt an die Lugano-Klassifikation der Hodentumoren: Stadium I- organbeschränkt, Stadium IIa- Vorliegen von retroperitonealen Lymphknotenmetastasen unter 2 cm Durchmesser, Stadium IIb- Vorliegen von retroperitonealen Lymphknotenmetastasen von 2- 5 cm Durchmesser, Stadium IIc- Vorliegen von retroperitonealen Lymphknotenmetastasen von > 5 cm Durchmesser	

Tabelle 2: Stadiengerechte Therapie nach den Leitlinien der Europäischen Gesellschaft für Urologie; gemäß Eisenhardt et al.(2008), S.404

Seminome und IGCNU zeigen im Prinzip sowohl auf Strahlentherapie als auch platinbasierte Chemotherapie ein sehr gutes Ansprechen. Nicht-Seminome hingegen sind vor allem chemotherapiesensibel und sprechen kaum auf Strahlentherapie an (Horwich et al. 2006). Diese Beobachtung wird auf Charakteristika ihrer Ursprungszelle und die unterschiedlich ausgeprägten embryonalen Eigenschaften der Entwick-

lungslinien zurückgeführt. Reife Teratomanteile (nach Verlust der embryonalen Eigenschaften) sind sowohl chemo- als auch strahlenresistent. Es kommen allerdings auch Nicht-Teratome und Seminome vor, die gegen platinbasierte Chemotherapie resistent sind. Es wurden auf molekularer Ebene einige Kandidatengene sowie epigenetische Variationen gefunden, die diesen Umstand erklären könnten. Hier wurden unter anderem eine Beteiligung des Methylierungsmuster in TGCT an Resistenzentwicklung und dem Verlust der embryonalen Eigenschaften (siehe oben) diskutiert. Die Hyper-Methylierung des CFLAR-Promotors und die hieraus resultierende Aktivierung seiner Transkription wurde beispielsweise mit Platin-Resistenz in Verbindung gebracht (Korkola et al. 2009). Des Weiteren werden Mikrosatelliteninstabilitäten und Mutationen im BRAF-Onkogen neben vielen weiteren Kandidatengenen als mögliche resistenz-begünstigende Veränderungen beschrieben (Honecker et al. 2009; Mayer et al. 2002, Velasco et al. 2004 a,b)

1.2 Valproinsäure (VPA)

Valproinsäure ist ein sehr vielseitiges Pharmakotherapeutikum. Bei dem Wirkstoff handelt es sich um eine verzweigtkettige organische Säure (2-Propylpentansäure) mit einer guten Bioverfügbarkeit. VPA kann sowohl oral als auch intravenös appliziert werden. Obwohl VPA weitestgehend gut vertragen wird, können unter der Therapie mit VPA starke Nebenwirkungen auftreten. Hierbei sind besonders die teratogene Wirkung, Blutbildveränderungen mit vermehrter Blutungsneigung, Hepato- und Pankreatotoxizität zu nennen (Chateauvieux et al. 2010).

Seine erstmalige Anwendung fand VPA als Antikonvulsivum. 1973 wurde VPA für diese Anwendung in Deutschland zugelassen und wird bis heute wegen seiner guten Verträglichkeit und seiner Wirkung auf verschiedene Epilepsieformen häufig verwendet. Als Wirkmechanismus werden eine Hemmung von aktivierenden Calcium- und Natriumkanälen sowie die Verstärkung der inhibitorischen Wirkung von GABA (Gammaaminobutyrat) diskutiert. VPA hielt Einzug in ein neues therapeutisches Feld im Jahre 1995, als es zur Phasenprophylaxe bipolarer Störungen, besonders bei manischen Verläufen, zugelassen wurde. Es folgten weitere Anwendungsgebiete wie Migräneprophylaxe und Therapie des Clusterkopfschmerzes, in denen VPA positive Wirkung zeigte.

Im Jahr 2001 konnten Göttlicher et al. eine neue Eigenschaft des Wirkstoffs beschreiben. Anhand von myeloischen Leukämiezellen konnte er zeigen, dass VPA antitumorös wirken kann. Hierbei wurde VPA als neuer Wirkstoff der Klasse der Histondeacetylase-Inhibitoren (HDACi) vorgestellt (Göttlicher et al. 2001).

1.3 Histondeacetylasen (HDACs)

HDACs spielen in der epigenetischen Regulation des Zellstoffwechsels, der Zellentwicklung und Differenzierung eine wichtige Rolle (Delcuve et al. 2009).

Es werden vier Gruppen der HDACs, gemäß der Sequenz- und Domänenverwandschaft mit ihren orthologen Enzymen aus Hefen, unterteilt. Die einzelnen Gruppen unterscheiden sich zudem in der von ihnen katalysierten Reaktion. Gruppe *Eins* (HDAC-Subtypen 1, 2, 3, 8) und *Zwei* (HDAC-Subtypen: 4, 5, 7, 9) katalysieren die Zink-abhängige Hydrolyse von Acetyl-Lysin-Aminoverbindungen im N-terminalen-Bereich von Histonproteinen. Die HDACs der Gruppe *Drei* sind evolutionsbiologisch nicht mit den Gruppen *Eins*, *Zwei* und *Vier* verwandt. Sie katalysieren die Übertragung von Acetylgruppen auf den Zuckeranteil des Nikotinamidadenin-dinukleotidmoleküls (Blander und Guarente 2004). Die Gruppe *Vier* der HDACs bildet die allein in höheren Eukaryoten vorkommende HDAC 11, welche ebenfalls Zink-abhängige Hydrolyse katalysiert. Sie entwickelte sich anders als die Enzyme der Gruppe *Eins* und *Zwei* und wird deshalb separat gezählt (Gallinari et al. 2007).

Die HDACs fungieren als Gegenspieler der Enzymgruppe der Histonacetyltransferasen (HATs). Von diesen wird die Acetylierung von Lysinresten im N-Terminus von Histonproteinen katalysiert (Marks et al. 2003; Roth et al. 2001).

Neben den oben beschriebenen enzymatischen Funktionen werden vermehrt weitere Funktionen einzelner HDACs diskutiert. So zeigt sich, dass neben den Histonen auch andere Proteine im Zellstoffwechsel einer Deacetylierung unterliegen und so in ihrer Funktion verändert werden (Glozak et al. 2005). Des Weiteren steht bei einzelnen HDAC-Typen nicht die enzymatische Aktivität, sondern die Wirkung in Komplexen mit anderen Proteinen im Vordergrund. Hier seien Transkriptionsfaktoren oder mit Chromatin-interagierende Proteine genannt (Gallinari et al. 2007). Der HDAC-Subtyp-3 liegt interessanterweise nicht nur im Kern einer Zelle vor, sondern auch im Zytosol und interagiert dort mit membranständigen Proteinen (Longworth und Laimins 2006).

Die Wirkung der HDAC-Proteine unterliegt selbst strengen Kontrollmechanismen. Zu diesen zählen die Einbindung in Co-Repressor- bzw. Co-Aktivator-Komplexe, die Aktivitätskontrolle durch Protein-Proteininteraktionen oder die posttranslationale Modifikation der HDAC-Moleküle durch beispielsweise Phosphorylierung.

Die besondere Bedeutung des Acetylierungsstatus der Histonproteine wird im Folgenden erläutert.

Histonproteine dienen der Organisation der DNA im Zellkern. Bestehend aus acht Untereinheiten (zwei Histon-H2A-Proteine, zwei Histon-H2B-Proteine, zwei Histon-H3-Proteine und zwei Histon-H4-Proteine) bilden sie Histonoktamere. Die positive Partialladung der Aminosäureketten der Histonproteine tritt in Wechselwirkung mit dem partial negativen DNA-Gerüst und bildet so ein Nucleosom (**Abb. 3**). Aus mehreren Nucleosomen entsteht das Chromatin. Das Histonprotein 1 fungiert hierbei als Verbindung zwischen zwei Nucleosomen und dient somit der Stabilisierung und Aufrechterhaltung der höheren Ordnung des Chromatins. Im N-Terminus der Aminosäureprimärstruktur der Histonproteine findet sich mehrfach die Aminosäure Lysin. Diese Lysin-Reste können unterschiedlich modifiziert werden (**Abb. 3**), wobei besonders Acetylierungen und Methylierungen der ϵ -Aminogruppe eine Rolle spielen.

Bei einer vermehrten Acetylierung (Hyperacetylierung) durch die oben beschriebenen HATs kann die DNA, wegen Störung der Wechselwirkung zwischen Histonprotein und DNA, nicht mehr an die Histonoktamere kondensieren. Die DNA liegt somit in einer offenen Form vor und kann vom Transkriptionsapparat erkannt werden (Lee und Young 2000). Umgekehrt kann die Deacetylierung (Hypoacetylierung) durch die HDACs über eine stärkere Histon-DNA-Bindung zu einer verminderten Genexpression führen.

Neben der beschriebenen Änderung des Acetylierungsmusters von Histonproteinen gibt es viele weitere Möglichkeiten der epigenetischen Modifikation wie Histonmethylierung (**Abb.3**), Histonphosphorylierung, Cytosin-Guanosin(CpG)-Insel-methylierung der DNA, Ubiquitinierung, Sumoylierung und ADP-Ribosylierung, die den Zellstoffwechsel und die Expression von Genen beeinflussen können (Jason et al. 2002; Jenuwein und Allis 2001; Lachner und Jenuwein 2002; Looijenga et al. 2007; Nathan et al. 2003; Nowak und Corces 2004).

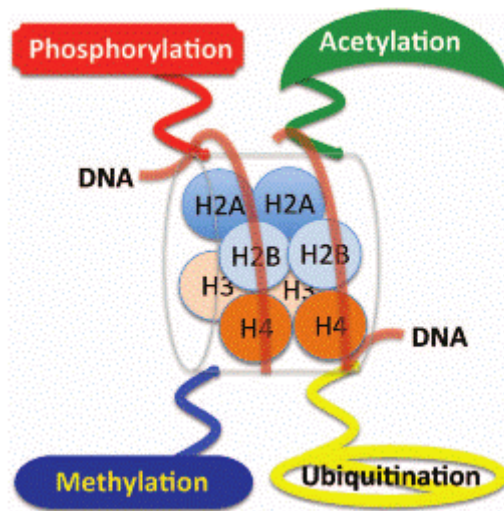


Abbildung 3: Die Abbildung zeigt die DNA-Organisation im Verbund mit Histonproteinen, Nucleosomen und Chromatin. Des Weiteren werden die Lysin-Acetylierung, Lysin-Methylierung, Phosphorylierung und Ubiquitinierung als Modifikationen der Histonproteine und der DNA gezeigt. Gemäß Hunt (2013); S.384

1.4 Histondeacetylase-Inhibitoren (HDACi)

Es ist bekannt, dass viele Tumoren ein verändertes Histonacetylierungsmuster und eine Überexpression von HDACs zeigen. Die so veränderte Expression von z.B. Tumorsuppressorgenen oder zellzyklusregulierenden Genen schützt so den vitalen Tumor (Göttlicher et al. 2001).

Die Gruppe der HDACi greift an dieser Stelle an und soll die Wirkung der HDAC-Enzyme verändern. Eine gesteigerte Acetylierung der Histone soll zur Expression der zunächst blockierten Gene führen und hierdurch zur Tumorstillung oder zum Absterben des Tumors. Über noch nicht genau geklärte Prozesse verändern HDACi ebenfalls das DNA-Methylierungsmuster bzw. bewirken, dass methylierte DNA dem Transkriptionsapparat besser zugänglich ist (Cervoni und Szyf 2001). In Brustkrebszelllinien konnte gezeigt werden, dass VPA neben HDACs Proteine, die für die Struktur des Chromatins von Bedeutung sind, beeinflusst. Hier sind die Proteine SMCs 1-6 (Structural Maintenance of Chromatin 1 bis 6), DNMT1 (DNA methyl transferase 1) und HP1 (Heterochromatin Protein 1) zu nennen (Marchion et al. 2005). Die Suppression dieser Gene führt ebenfalls zu einer De-Kondensation des Chromatins.

Göttlicher et al. (2001) untersuchte die Wirkung von VPA am Beispiel der akuten Promyelozytenleukämie (PML). Bei der PML entsteht durch eine chromosomale Translokation t (15;17) ein Retinsäurerezeptorfusionsprotein, welches mit einem Co-Repressorkomplex interagiert. Dieser unterdrückt in Verbindung mit HDACs die Expression von oben beschriebenen Gengruppen (Tumorsuppressorgene, differenzierungs-assoziierte Gene). Die Behandlung eines Patienten mit VPA führte zur Aufhebung des Differenzierungsblocks und zur Apoptose der Tumorzellen (Göttlicher et al. 2001).

Die Gruppe der HDAC-Inhibitoren setzt sich aus heterogenen Molekülgruppen zusammen, wobei die Wirksamkeit der einzelnen Stoffe stark variiert. Hiervon erhielt der Wirkstoff Vorinostat/Zolinza (SAHA= suberoylanilide hydroxamic acid) als Drittlinientherapie von Hautmanifestation beim kutanen T-Zell-Lymphom als erster HDAC-Inhibitor seine Zulassung (Kelly et al. 2005; Olson E et al. 2006; Richon et al. 1996).

1.5 Zielsetzung

Die Wirkung von VPA auf unterschiedliche hämatologische und solide Tumorentitäten wurde in vielen Studien erforscht, wobei sowohl die direkte tumortoxische Wirkung als auch die Fähigkeit, die tumortoxische Wirkung von anderen Wirkstoffen zu erhöhen, untersucht wurden (Bug et al. 2005; Inoue et al. 2005; Soriano et al. 2007).

Im Rahmen meiner Dissertation beschäftigte ich mich mit der Wirkung von VPA auf maligne Keimzelltumoren des Hodens. Zunächst sollte die Wirkung in vivo im Mausmodell untersucht und anschließend in vitro auf molekularer Ebene genauer betrachtet werden.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Chemikalien und biochemische Agenzien

Chemikalie / Agens	Produzent
100% Aceton	Merck, Darmstadt, Deutschland
10 x Blocking Agent	Agilent, Böblingen, Deutschland
10 x Inkubations-Puffer	Roche, Mannheim, Deutschland
20% N-Lauroylsarcosine	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
20 x Lauf-Puffer	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
20 x SSPE	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
25 x Fragmentations-Puffer	Agilent, Böblingen, Deutschland
2 x HIRPM Hybridizations-Puffer	Agilent, Böblingen, Deutschland
75% Ethanol (in DEPC-Wasser)	Merck, Darmstadt, Deutschland
Acetonitril	VWR International GmbH, Darmstadt, Deutschland
Histon-H3-AK	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
Acetyl-Histon-H3-AK	Santa Cruz Biotechnology, Heidelberg, Deutschland
Anti-active-Caspase-3-AK	R&D, Wiesbaden, Germany
Goat-anti-Rabbit-AK (Biotin konjugiert)	Dako, Hamburg, Deutschland
Bio-Rad Protein-Dye-Assay	BioRad, München, Deutschland
Chloroform	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Colorimetric cell proliferation assay (CellTiter 96® Aqueous-Assay (MTS assay))	Promega, Mannheim, Deutschland
Dako REALTM EnVision™ Detection System Peroxidase/DAB+, Rabbit/Mouse	Dako Hamburg, Deutschland
DNase-I	Roche, Mannheim, Deutschland
Fötale Kälberserum (FCS)	CC Pro, Neustadt, Deutschland
Glycin	Roth, Karlsruhe, Deutschland
GlycoBlue	Ambion, Austin, USA
HEPES Buffer Solution	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
HOPE-I-Protektionslösung	DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Hamburg, Deutschland

HOPE-II-Konzentrat	DCS Innovative Diagnostik-Systeme, Hamburg, Deutschland
Isopropylalkohol	Merck, Darmstadt, Deutschland
L- Glutamine 200mM	Life Technologies, Karlsruhe, Deutschland
LDS Samplepuffer +4x Bromphenolblau	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Low RNA input fluor linear amp kit	Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland
Magermilchpulver	Merck, Darmstadt, Deutschland
Matrigel	Fa. Becton Dickinson, Heidelberg, Deutschland
Mäusefutter	Ssniff Spezialdiäten GmbH, Soest, Deutschland
May-Giemsa-Grünwaldlösung	Merck, Darmstadt, Deutschland
Medium RPMI	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
Natriumacetat	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Nitrocellulose-Membran	Schütt, Göttingen, Deutschland
NTERA-2-Zelllinie	American Type Culture Collection, Manassas, USA
Nuc Buster Extraction-Kit	Kalbiochem, Novabiochem, Novagen, Darmstadt, Deutschland
Omniscript RT-Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
PBS-Puffer (PBS Dolbecco)	Biochrom AG, Berlin, Deutschland
PCR-Mini-Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
Penicillin/Streptomycin (Pen/Strep.)	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Phenol/Chloroform/Isoamylalkohol	Roth, Karlsruhe, Deutschland
Primer	MWG, Ebersberg, Deutschland
Rainbowmarker	GE Healthcare, Freiburg, Deutschland
Random-hexamer-Primer	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Reduktionsreagenz	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
RNA SpikeInKit, two color	Agilent, Böblingen, Deutschland
RNase OUT	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
RNase freies Wasser	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
RnaseZAP	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
RNeasy Extraction Mini Kit	Qiagen, Hilden, Deutschland
SDS-PAGE Gel (10Well)	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
SuperMount Medium	Dako, Hamburg, Deutschland
The QuickAmp labelling Cy3/Cy5two color	Agilent, Böblingen, Deutschland
TCam-2-Zelllinie	Abteilung Pathologie, Universität Bonn, Deutschland

Tris	Roth, Karlsruhe, Deutschland
TRIZol Reagent	Invitrogen, Karlsruhe, Deutschland
Trypsin- EDTA (TEA)	GIBCO, Neu Isenburg, Deutschland
Valproinsäure (VPA) Trockenpulver	Sigma-Aldrich, München, Deutschland
Valproinsäure-Saft (Orfirilsaft)	Desitin Arzneimittel GmbH, Hamburg, Deutschland
Valpromide (VPM)	Katwijk Chemie B.V., Katwijk, Niederlande

2.1.2 Gebrauchsmaterialien

Gebrauchsmaterialien	Produzent
0,45X12 mm Kanülen	Braun, Melsungen, Deutschland
Cytofunnels	Tharmac, Waldsolms, Deutschland
E-Cups (0,2ml,1,5ml, 2ml)	Sarstedt AG u. Co., Nümbrecht, Deutschland
Einmal-Insulinspritzen	Braun, Melsungen, Deutschland
Kulturflaschen: 75cm ² , 25cm ²	Sarstedt AG u. Co., Nümbrecht, Deutschland
Pasteur-Pipetten 150mm	Wu, Mainz, Deutschland
Pasteur-Pipetten 230mm	Brand, Wertheim, Deutschland
Pipetten (1000µl, 100µl, 10µl, 2,5µl)	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Pipetten-Spitzen	Sarstedt AG u. Co., Nümbrecht, Deutschland
Port-Objektträger	Knittel Glas, Braunschweig, Deutschland
PP Test tubes 50ml,14ml	Greiner bio-one, Frickenhausen, Deutschland
Röntgenfilm Schreddersäule	Hyperfilm ECL, Amersham Buchler, Braunschweig Qiagen, Hilden, Deutschland
Serologische-Pipetten 25ml,10ml,5ml	Sarstedt AG u. Co., Nümbrecht, Deutschland
Zell-Schaber 25cm	Sarstedt AG u.Co., Nümbrecht, Deutschland

2.1.3 Technische Geräte

Gerät	Produzent
Agilent 2100 BioAnalyzer	Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland
Bioclav	Schütt GmbH, Göttingen, Deutschland
Biofuge fresco	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland
Biofuge stratos	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland
BioTek µQuant™ Microplate Spectrophotometer	BioTek, Bad Friedrichshall Deutschland
G2505B Micro Array Scanner	Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland

HeaSafe Sterilbank	Heraeus Instruments GmbH, Hanau, Deutschland
Hybridisierungsöfen	Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland
Hybridisierungsöfen	Biometra, Göttingen, Deutschland
Hybridization Chamber	Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland
Kühlschränke	Bosch, Gerlingen-Schillerhöhe, Deutschland
Magnetrührer	IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Megafuge 1,0R	Heraeus Sepatech, Osterode, Deutschland
Mikroskop	Zeiss, Göttingen, Deutschland
Mikrowelle	Sharp, Hamburg, Deutschland
NanoDrop Photometer	Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland
ND1000 Heating Block Thermocycler	Peqlab, Erlangen, Deutschland
pH-Meter	inoLab, Weilheim, Deutschland
PowerPac200	BioRad, München, Deutschland
Schüttler	IKA® Werke GmbH & Co. KG, Staufen, Deutschland
Shandon Cytospin 4	Thermo Fischer, Dreieich, Deutschland
Thermomixer 5436	Eppendorf AG, Hamburg, Deutschland
Tissue Tek Prisma	Sahera Finetek, Heppenheim, Deutschland
Vortex Genie 2	Bänder u. Hobein AG, Zürich, Schweiz
Waage	Sartorius AG, Göttingen, Deutschland
Weitere Gebrauchsgegenstände	Agilent Technologies, Böblingen, Deutschland

2.1.4 Tiere

Athymische Nacktmäuse	Charles River, Sulzfeld, Deutschland
-----------------------	--------------------------------------

2.2 Methoden

2.2.1 Valproinsäure

Aus VPA-Trockenpulver wurde eine 100-mM-Grundlösung mit serumfreiem Medium hergestellt. Die Grundlösung wurde mit Zellkulturmedium verdünnt, um gewünschte Zielkonzentrationen zu erreichen (1, 2,5 und 5 mM).

Während der meisten Versuche wurde eine Zielkonzentration von 5mM als höchst verträgliche nicht toxische Dosis verwendet.

Den Versuchstieren wurde VPA oral (Orfiril®) mit dem Trinkwasser verabreicht.

2.2.2 Zellkultur

2.2.2.1 NTERA-2-Zelllinie

NTERA-2-Zellen sind Abkömmlinge eines pluripotenten humanen EC, ähneln morphologisch Fibroblasten und wachsen einschichtig adhäsiv.

Als Kulturmedium wurde ein Gemisch aus RPMI-1640 mit 100 IU/ml Penicillin, 100µg/ml Streptomycin, 2mM L-Glutamin, inaktiviertem 10% fetalem Kälberserum und 2,5% 1M HEPES verwendet. Das Arbeiten mit den Zellkulturen und das Ansetzen des Kulturmediums erfolgten stets unter sterilen Bedingungen unter einer dafür vorgesehenen Sterilbank. Alle hierbei benötigten Gegenstände wie Pipetten oder Zellschaber sind vom Hersteller steril verpackt, vorher autoklaviert, und zusätzlich bei Benutzung, mit einem Bunsen-brenner abgeflämmt worden. Um optimale Wachstumsbedingungen zu erzielen, wurden die Zellen in einem Brutschrank bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Die Kultivierung begann mit einer Zellzahl von 5 X 10⁶ Zellen in einer Kulturflasche von 75 cm² und einem Volumen des Kulturmediums von 15 ml. Zunächst adhärirten die Zellen am Flaschengrund und bildeten innerhalb von 3-4 Tagen eine geschlossene Zellschicht.

Um den optimalen Zeitpunkt des Passagierens zu erfassen und zu volle Kulturflaschen mit einem möglichen Absterben von Zellen zu vermeiden, erfolgten regelmäßige Vitalitätskontrollen unter einem Mikroskop. Des Weiteren signalisierten Farbveränderungen des Kulturmediums von Rot (frisches Medium) hin zu Gelb (nährstoffarmes Medium) einen nötigen Wechsel des Kulturmediums an.

Um die Zellen zu passagieren, wurde zunächst das Kulturmedium mit einer Pasteurpipette aus den Kulturflaschen abgesaugt. Hiernach wurde auf den Zellrasen, zur Mobilisierung der Zellen, 4ml Trypsin-EDTA gegeben und erneut für ein paar Minuten im Brutschrank inkubiert. Schwammen die Zellen frei im Trypsin-EDTA, so wurde diese Suspension mit einer Pipette in ein 50-ml-Tube überführt und mit PBS-Puffer verdünnt. Die Verdünnung erfolgte, um die Zytotoxizität des Trypsin-EDTA abzuschwächen. Anschließend wurde die Suspension bei 1200 RCF für vier Minuten zentrifugiert. Hierbei bildete sich ein sichtbares Zellpellet. Der Überstand wurde mit einer Pasteurpipette abgenommen und verworfen, während das Pellet in PBS-Puffer resuspendiert und nochmals zentrifugiert wurde. Dieser Vorgang diente dem Reinigen der Zellen und konnte unterschiedlich häufig wiederholt werden. Üblicherweise erfolgten zwei bis drei Reinigungsschritte.

Nach Beendigung des letzten Reinigungszyklus wurden die Zellen in Kulturmedium aufgenommen, mit Hilfe einer Neubauer-Zählkammer ausgezählt und 5×10^6 Zellen in neue Kulturflaschen überführt. Zum Schluss wurden 15ml Kulturmedium hinzugefügt.

Um die Zellen über einen längeren Zeitraum zu lagern, wurden sie in flüssigem Stickstoff (-192°C) kältekonserviert. Hierfür wurde ein spezielles Einfriermedium bestehend aus 95% Kulturmedium und 5% „Cell freezing medium DMSO“ verwendet, wobei das DMSO als Frostschutzmittel diente. Im Anschluss an die zuvor beschriebenen Waschschrirte wurde das Pellet in 1ml Einfriermedium resuspendiert und in Einfriergefäße überführt. Diese wurden zunächst für zwei Tage bei -80°C und anschließend in flüssigem Stickstoff gelagert.

Beim Auftauen wurde die gefrorene Zellsuspension zügig mit 37°C warmem Kulturmedium umspült und somit gleichzeitig verdünnt, um die Zytotoxizität des DMSO zu minimieren. Die Suspension wurde in ein 50-ml-Tube überführt. Anschließend erfolgten wie beschrieben einige Waschschrirte mit PBS und das Kultivieren im Kulturmedium.

2.2.2.2 TCam-2-Zelllinie

Die Zelllinie TCam-2 wurde uns freundlicherweise von Prof. Hubertus Schorle (Abteilung Pathologie, Universität Bonn) zur Verfügung gestellt. Diese Zelllinie entstammt einem seminomatösen Keimzelltumor (Eckert et al. 2008). Die Zellen sind polygonal, zeigen einen engen Zellkontakt und ein stärkeres Wachstum als in losen Zellverbänden. Das Kultivieren, Passagieren und Kryokonservieren der TCam-2-Zellen entsprach des Prozederes für die NTERA-2-Zelllinie.

2.2.3 Tierversuch

Im Tumormausmodell wurde die Wirkung von VPA auf Keimzelltumoren in-vivo untersucht.

2.2.3.1 Versuchsaufbau

Nach einer Eingewöhnungsphase von zwei Wochen in Standardkäfigen mit Luftfiltern wurden die Versuchstiere in Gruppen von je 15 prophylaktisch, 15 nach Tumorstwachstum zu behandelnde und 15 Kontrollmäuse aufgeteilt. Diesen Mäusen wurden Zellen der NTERA-2-Zelllinie injiziert. Weitere zwei Gruppen zu je neun Tieren wurden zur Untersuchung der TCam-2-Zelllinie verwendet.

Den Versuchstieren wurde jeweils ein Depot von 10^6 Zellen einer Zelllinie, gelöst in 100µl PBS-Puffer und 100µl Matrigel, in den Nacken injiziert. Die Injektion erfolgte mit 0,45 X 12 mm Kanülen und „Einmal-Insulinspritzen“.

Eine Gruppe von Mäusen erhielt prophylaktisch ab dem Zeitpunkt der Injektion, die andere Gruppe ab einer palpablen Tumorgöße (~28 Tage) VPA in Form von Orfiril-Saft oral mit dem Trinkwasser verabreicht. Die Medikamentenkonzentration betrug hierbei ~400mg/ kg KG/d. Die Kontrollgruppe erhielt weiterhin Wasser.

Da sich die Tumorwachstumsraten der beiden Zelllinien unterschieden, wurden die Versuche nach verschiedenen Zeitpunkten beendet. Die Mäuse der NTERA-2-Zelllinie wurden nach 75 Tagen getötet, die Tiere der TCam-2-Gruppe entsprechend nach 90 Tagen. Die Mäuse wurden mit einer Überdosis Kohlenstoffdioxid getötet. Nach der Tötung erfolgte die Entnahme der Tumoren mit Größenbestimmung und Gewichtserfassung (**Abb.4**).

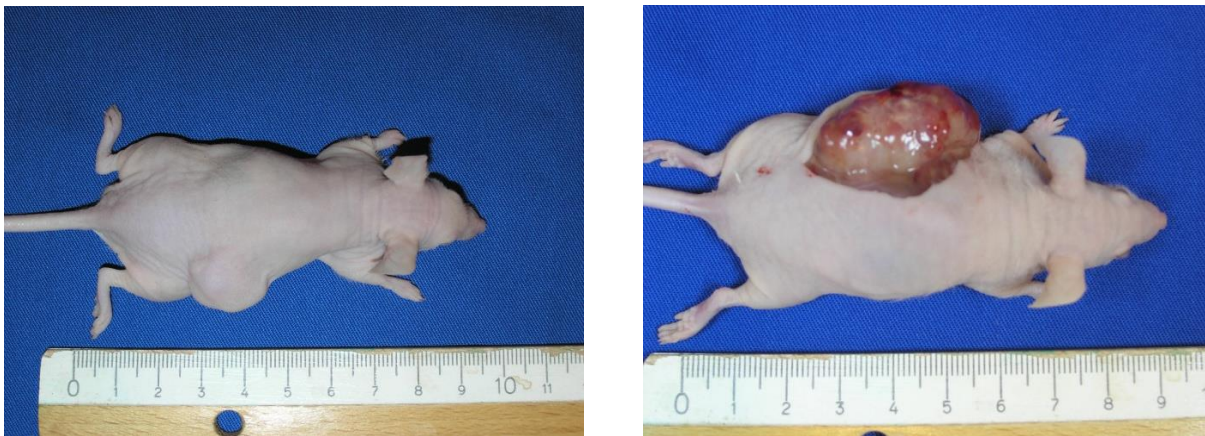


Abbildung 4: In-vivo-Mausmodell mit gewachsenen Tumoren. Entnahme der Tumoren.

2.2.3.2 Versuchstiere

Für die Versuche wurden ausschließlich männliche 25-30g schwere nu/nu-Nacktmäuse (Charles River, Sulzfeld) benutzt. Die Tiere hatten freien Zugang zu Trinkwasser und Mäusefutter und wurden in einem zwölfstündigen Tag-Nacht-Rhythmus gehalten. Die Versuche wurden in der Tierexperimentellen Einrichtung der Universitätsmedizin Göttingen durchgeführt (Leiterin: Fr. Dr. vet. med. Sarah Kimmina)

Der Versuch wurde vom Niedersächsischen Landesamt für Verbraucherschutz und Lebensmittelsicherheit Braunschweig genehmigt und den Tierschutzbestimmungen entsprechend durchgeführt (Referenznummer 33.11.42502-04-058/07).

2.2.4 Morphologie (Cytospins)

Die mit VPA behandelten Kontroll-Zellen wurden mittels Zentrifugation auf Objektträgern fixiert und mit der May-Grünwald-Giemsa-Färbung sowie der Caspase-3-Färbung untersucht. Mit 5mM VPA über 24h behandelte sowie unbehandelte Zellen wurden isoliert, mit PBS-Puffer gewaschen und je 10×10^5 Zellen auf den Objektträgern fixiert.

Die Färbungen wurden nach üblichen Standardverfahren durchgeführt.

2.2.5 Mikroarray-Expressionsanalyse

Die Methode des cDNA-Microarrays wird genutzt, um die Genaktivität in einem Gewebe oder in Zellen zu bestimmen. Betrachtet wurden im vorliegenden Versuch die Genaktivitäten von Zellen der NTERA-2-Zelllinie und der TCam-2-Zelllinie unter zwei verschiedenen Bedingungen: Zum einen jeweils 24 Stunden behandelt mit 5mM VPA und zum anderen nativ ohne Behandlung als Kontrolle (**Abb.5**).

Die Mikroarray-Gen-Analyse wurde in Kooperation mit dem Transkriptomanalyselabor, Universitätsmedizin Göttingen, durchgeführt. Die Versuchsschritte wurden von mir unter Anleitung durchgeführt.

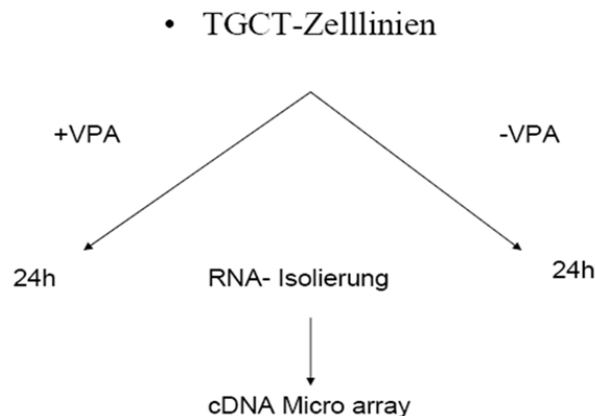


Abbildung 5: Versuchsaufbau zur Durchführung der Microarray-Expressionsanalyse.

Zunächst wurde RNA gemäß dem „Standard Operating Procedure“(SOP) Protokoll „RNA Isolation from cell cultures with TRIzol Reagent“ (TAL 002.1) RNA aus den TGCT- Zelllinien gewonnen. Die gewonnenen Proben wurden über Nacht mit einer DNase (gemäß SOP Nr. TAL006.1 „DNase I-treatment of RNA“) behandelt. Anschließend wurde die Integrität der RNA mittels eines „Nano Drop“-Photometers und eines Agilent-Bioanalyzers bestimmt (**Abb.6 u.7**).

Die verwendeten Proben wiesen alle einen den Reinheitsgrad beschreibenden „RNA integrity number“ (RIN Nummer) von mindestens größer als 8,9 (Werte von 1-10 sind möglich, wobei 10 die reinste Stufe darstellt) auf. In Abbildung 6 und 7 sind als Beispiel die photometrische Quantifizierung sowie die Qualitätsbestimmung des ersten Mikroarray-Versuchs, welcher mit der Zelllinie NTERA-2 durchgeführt wurde, abgebildet (**Abb.6 u.7**).

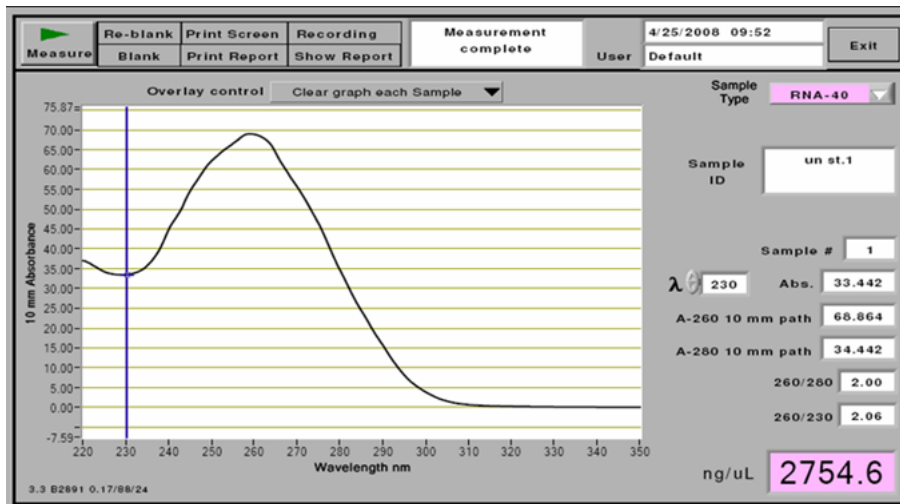


Abbildung 6: RNA-„Nano Drop“-Photometermessung am Beispiel der NTERA-2-Zelllinie.

Die Proben wurden aufgeteilt. Ein Anteil wurde für die Mikroarray-Genanalyse, der zweite Anteil für die Mikroarray-Ergebnisevaluierung mittels Quantitativer-real-time PCR verwendet.

Im nächsten Schritt wurde die RNA mit Hilfe des "Low RNA input fluor linear amp kit" umgeschrieben, amplifiziert und markiert. Die Markierung erfolgte nach dem „two-color“-Prinzip. Dies bedeutet, dass zwei unterschiedliche Fluoreszenz-markierte Nukleotide verwendet wurden. Zum Abschluss erfolgte die Hybridisierung der Proben auf einem Mikroarray-Chip gemäß „Agilent 60-mer oligo microarray processing protocol v2.1“ (SOP Nr. TAL008.3).

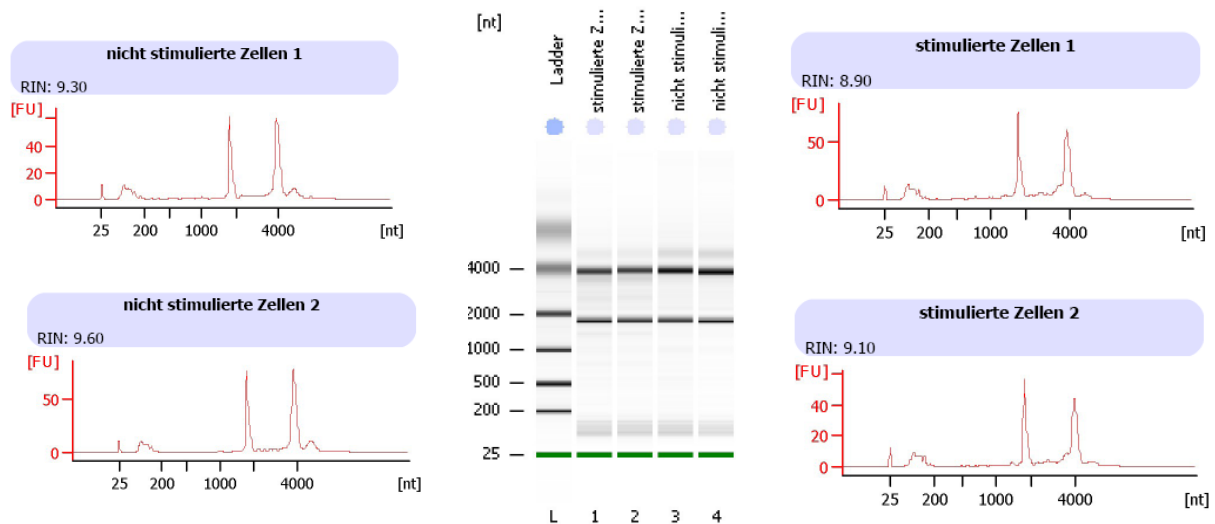


Abbildung 7: RNA-Integritätsmessung am Beispiel des NTERA-2-Zelllinien-Versuchs.

Folgende Änderungen wurden am Protokoll vorgenommen:

1. Pro Kanal wurden zwei Mikrogramm markierte DNA zusammengemischt.
2. Die Proben wurden bei 98°C für drei Minuten denaturiert.
3. Die Hybridisierung erfolgte bei 65°C.
4. Die Arrays wurden wie empfohlen kurz in Acetonitril gewaschen und dann getrocknet.

Die Arrays wurden mit einem G2505B-Mikroarray-Scanner gelesen. Die Quantifizierung der Fluoreszenzintensitäten jedes einzelnen Merkmals auf dem Mikroarray erfolgte mit der "Feature Extraction 9.5.3"-Software von Agilent.

Die statistische Auswertung wurde von Herrn Opitz im Transkriptomanalyselabor Humanmedizin Göttingen durchgeführt.

Statistisches Prozedere:

1. Normalisierung nach dem „loess regression“-Verfahren (Yang YH et al. 2002) zur Minimierung technischer Streueffekte.
2. Herstellung einer Vergleichbarkeit der Expressionslevel der Arrays durch Skalierung jedes Arrays an der eigenen Standardabweichung.
3. Errechnung der Expressionsunterschiede jedes Oligonukleotidspots mit dem „fixed effects model“ (ANOVA) (Landgrebe et al. 2006).
4. P-Wert Abgleich mit der Benjamini-Hochberg-Methode.

2.2.6 Nukleinsäureanalytik

Die Nukleinsäureanalytik beider Zelllinien diente zum einen der Evaluierung der Mikroarray-Ergebnisse, zum anderen der Untersuchung ausgewählter embryonaler Stammzellfaktoren.

2.2.6.1 RNA-Isolierung

Für einen Anteil der Nukleinsäureanalytik wurde auf die mittels der „Trizol-Reagenz“-Methode gewonnene RNA zurückgegriffen. Zur Analyse der embryonalen Wachstumsfaktoren wurde in einem separaten Versuchsansatz RNA mit einem RNeasy extraction Mini Kit isoliert.

Beide Zelllinien TCam-2 und NTERA-2 wurden mit 5mM VPA über 24h behandelt. Als Kontrolle diente eine äquivalente Menge unbehandelter Zellen.

Die Zellen wurden mittels eines Zellschabers geerntet und, nach zweimaligem Waschen mit PBS, in β -ME/RLT-Lysispuffer (1:100 1 μ l β -ME+99 μ l RLT-Lysispuffer) aufgenommen. Nach kurzer Inkubationszeit auf Eis wurde das Zellgemisch mit einer Quiagen-Auftrennsäule vorgereinigt.

Anschließend folgten eine Fällung mit Ethanol und die Bearbeitung des Durchflusses. Dieser Vorgang beinhaltet mehrere mit Säulen und unterschiedlichen Lösungen (RW1, RPE) durchzuführende Wasch- und Aufreinigungsschritte. Die Integrität wurde mittels eines Agilent-Bioanalyzers ermittelt.

Die gewonnene RNA wurde in RNase-freiem Wasser gelöst und bei -80°C gelagert.

2.2.6.2 Reverse-Transkription (RT)

Zur Durchführung einer quantitativen PCR, muss zunächst gewonnene RNA mit der Methode der RT in komplementäre cDNA umgeschrieben werden.

Dieser Vorgang wurde mit dem Omniscript RT-Kit durchgeführt.

Zunächst erfolgte der Ansatz einer Arbeitslösung aus RT-Puffer, Desoxyribonucleotiden, Hexaprimer, RNase-Inhibitor und dem Enzym Reverse-Transkriptase. Pro Probe wurden 500ng RNA eingesetzt. Die Menge an einzusetzender RNA-Lösung ergab sich aus der beim Mikroarray-Versuch per „Nano Drop“- Messung ermittelten RNA-Konzentration.

Die einzusetzende RNA-Menge wurde mit nucleotidfreiem Wasser aufgefüllt und das Wasser-RNA-Gemisch anschließend bei 70°C fünf Minuten im Thermocycler

inkubiert. Dieser Schritt dient der Denaturierung der RNA und der besseren Anlagerung des Hexaprimers. Es folgte das kurze Abkühlen auf Eis und die Zugabe von 7µl der Arbeitslösung. Die Proben wurden gemischt, bevor sie wiederum im Thermocycler für eine Stunde bei 37°C inkubierten. Während dieser Stunde wurde die RNA durch die RTase in cDNA umgeschrieben. Durch ein fünf-minütiges Aufheizen der Proben auf 95°C wurde die Reaktion der RT mit der RNA abgestoppt. Die so gewonnene cDNA-Lösung wurde mit 80µl RNA-freiem Wasser aufgefüllt und konnte anschließend direkt für quantitative PCR-Versuche verwendet oder bei -20°C gelagert werden.

2.2.6.3 Quantitative-real-time-PCR (q-RT-PCR)

Die Methode der q-RT-PCR wurde zur Evaluation der Mikroarray-Versuche und zur Untersuchung von ausgewählten embryonalen Stammzellfaktoren verwendet. Es dienten bei der Evaluierung je sieben Gene als Kontrolle, welche unter Behandlung mit VPA im Arrayergebnis bei beiden Zelllinien vermehrt exprimiert oder supprimiert wurden.

Der Ansatz der PCR setzte sich wie folgt zusammen:

Zunächst wurde eine Grundmischung aus SybrGreen Mix (100mM KCl, 40mM Tris-HCl pH 8,4, je 0,4mM dNTPs, dATP, dCTP, dGTP, dTTP, iTaq DNA-Polymerase 50 UI/ml, 6mM MgCl₂, SYBR Green I, 20nM Fluoreszein und Stabilisierer), RNase-freiem Wasser und Forward- sowie Backwardprimer pipettiert. Zu jeweils 5µl Mischung wurden 5µl cDNA hinzu gegeben. Anschließend wurden die PCR-Tubes mit einer optischen Folie abgedichtet. Die Analyse erfolgte im Biorad I-Cycler.

Ergebnisse stellten sich als Cycle-Threshold (CT-Werte) dar, welche mit der „ $2^{(-\Delta \text{Delta } C(T))}$ Methode“ (Livak und Schmittgen 2001) ausgewertet und darstellbar gemacht wurden. Der CT-Wert gibt die Zyklenzahl an, bei welcher im Probengefäß eine bestimmte Produktkonzentration messbar wurde. Als Kontrolle und Housekeeping-Gen wurde ARP verwendet, welches durch die Behandlung mit VPA nicht beeinflusst wird.

Bei den meisten Genen war eine Zyklenzahl von 35 ausreichend. Lag ein Gen nur in sehr geringer Menge vor und konnte bei einem PCR Lauf mit 35 Zyklen kein Produkt nachgewiesen werden, so wurde ein weiterer Lauf mit 50 Zyklen durchgeführt.

PCR-Zyklusablauf	Dauer	Wiederholungen
Denaturierung und Aktivierung der iTaq-Polymerase bei 95°C	15min.	1x
Denaturierung bei 95°C	30sec.	35x
Primerannealing bei primerabhängiger Temperatur	90sec.	35x
Elongation bei 70°C	30sec	35x
Fluoreszenzmessung 70°C	10min	1x
Warteposition bei 4°C	-	-

Tabelle 3: Quantitative-real-time-PCR-Zyklenübersicht

Gene	Annealing (°C)	Sense	Antisense
ADRB2	57	5'-GGCAGCTCCAGAAGATTGAC-3'	5'-TCCTGGATCACATGCACAAT-3'
ARP	59	5'-CGACCTGGAAGTCCAAC-3'	5'-ATCTGCTGCATCTGCTTG-3'
ARRDC4	57	5'-CTGTCTTCTCGGAGGTGGAG-3'	5'-TCAGGTACCTTGGGTCGTTTC-3'
EGR2	58	5'-CGCCTCCTCCTTATTCT-3'	5'-CTGGGATCATTGGGAAGAGA-3'
GDF3	56	5'-TGCCATCAAAGAAAGGGAAC-3'	5'-GCAGGTGAAGTGAACAGCA-3'
HMGA2	57	5'-AAGCAGCAGCAAGAACCAAC-3'	5'-TTGTGGCCATTTCTAGGTC-3'
IGF 2	60	5'-GACACCCTCCAGTTCGTCTG-3'	5'-GGGGTATCTGGGAAGTTGT-3'
IGF2BP1	56	5'-AAACAAAGGAGCCGAAAAAT-3'	5'-CTCATCGGGGATGTAGGAGA-3'
MLF1	56	5'-TCGAGCTCCAGGAGGAATAA-3'	5'-CCTCATCAAAGCATGAGCA-3'
NANOG	58	5'-TTCCTTCCATCCATGGATCTG-3'	5'-ATCTGCTGGAGGCTGAGGTA-3'
OCT 3/4	58	5'-AGAAGGATGTGGTCCGAGTG-3'	5'-GTGAAGTGAGGGCTCCCATA-3'
PDPN	57	5'-TCTGCCAACTCAGAAAGCA-3'	5'-ACGATGATTGCACCAATGAA-3'
PPAP2B	59	5'-GACAGCAAAGTCCAGGAAGC-3'	5'-GTGGTCTGATACGCGAGACA-3'
SOX 17	58	5'-CAGAATCCAGACCTGCACAA-3'	5'-GCGGCCGGTACTTGTAGTT-3'
SOX 2	58	5'-CAAGATGCACAACTCGGAGA-3'	5'-CTCCGGGAAGCGTGTACTTA-3'
TDGF1	56	5'-ACAGAACCTGCTGCCTGAAT-3'	5'-AGAAATGCCTGAGGAAAGCA-3'
VDR	58	5'-GCCACCATAAGACCTACGA-3'	5'-AGATTGGAGAAGCTGGACGA-3'

Tabelle 4: Primerübersicht

2.2.7 Proliferationsassay

Zellwachstum und Proliferation wurden mittels „Colorimetric cell proliferation assay“ bestimmt. Es wurden 5×10^3 Zellen in 100 μ l Medium pro Well auf eine 96-Well-Platte gegeben und für 24h inkubiert. Anschließend wurden die Zellen für 24h mit VPA gelöst in Medium behandelt. Nach 24h wurde das Zellwachstum mittels 20 μ l „dye solution“ gestoppt und nochmals für zwei Stunden bei 37°C und 5% CO₂ inkubiert. Zur Analyse wurde ein Microplate Spectrophotometer verwendet. Hierbei wurde die Absorption bei 490 nm und als Referenz bei 650 nm gemessen.

2.2.8 Protein-Analytik

Um Vergleiche unserer Stimulationsversuchsergebnisse auf RNA-Ebene mit Veränderungen auf Proteinebene zu ermöglichen, wurden Proteine aus stimulierten wie auch unstimulierten Zellen beider Zelllinien gewonnen. Diese wurden gelelektrophoretisch nach Ladung und Molekulargewicht aufgetrennt, auf eine Nitrocellulosemembran geblottet und nach Primär-/Sekundärantikörperreaktionen mittels Chemielumineszenz sichtbar gemacht.

2.2.8.1 Protein-Extraktion

24h vor Beginn der Isolation wurden beide Zelllinien TCam-2 und NTERA-2 mit 5mM VPA behandelt. Eine zweite äquivalente Zellmenge diente jeweils unstimuliert als Kontrolle.

Mit einem Zellschaber wurden die Zellen aus der Kulturflasche geerntet und anschließend zweimal mit PBS gewaschen.

Alle weiteren Schritte wurden gemäß dem Nuc Buster Extraction™ Kit durchgeführt. Dies beinhaltet zwei Lyseschritte mit dem Nuc Buster Reagent-1, Nuc Buster Reagent-2 sowie eine Protease-Inhibitor-Behandlung. Die Kernproteine wurden nach Zentrifugation im Überstand isoliert.

Da die zu untersuchenden Gene auf Proteinebene vor allem im Kern zu finden sind, genügten uns selbige zur weiteren Untersuchung.

Die isolierten Proteine wurden jeweils als 50 μ g-Aliquot bei -80°C gelagert.

Des Weiteren wurden die Proteine mit der Methode nach Bradford quantifiziert. Durch die Bindung von Coomassie-Brilliant-Blau G 250 an Proteine verschiebt sich das Absorptionsmaximum des Farbstoffs (465 nm ohne Protein, 595 nm nach

Proteinbindung). Es wurde ein Protein-Assay der Firma Bio-Rad verwendet, die Durchführung folgte der entsprechenden Anleitung.

2.2.8.2 Westernblot

Ein Protein-Aliquot wurde zunächst mit eiskaltem Aceton gefällt und in WB-Probenpuffer (Tris/Glycinpuffer) aufgenommen. Jeder Probe wurde 10µl LDS-Samplepuffer 4XBromphenolblau und Reduktionsreagenz hinzugefügt. Dies diente der Proteinfärbung und der Vermeidung von intramolekularen Wechselwirkungen. Anschließend wurden die Proteine bei 95°C für 5min. denaturiert. Die Reaktion wurde auf Eis gestoppt.

Die Auftrennung erfolgte in einer vertikalen Gelelektrophoresekammer. Zunächst wurde ein 10 Wel Elektrophoreseigel in der Kammer positioniert. Hierdurch entstanden zwei Kompartimente. Das äußere Kompartiment wurde mit Lauf-Puffer („Running-Buffer“) gefüllt. Das innere Kompartiment wurde mit Lauf-Puffer, ergänzt mit Antioxidanz befüllt.

Die aufzutrennenden Proteine wurden in die Geltaschen pipettiert und die Kammer an eine Spannungsquelle angeschlossen.

Transfer-Puffer	Lauf-Puffer
3,028g Tris	50ml „MES-Running-Buffer“
14,413g Glycin	Innere Kammer + 400µl Antioxidanz
200ml Methanol	950ml Aqua bidest
1l Aqua bidest.	

Die Elektrophorese wurde 45 min. mit einer Spannung von 200 V durchgeführt.

Anschließend wurde das Gel in Transfer-Puffer überführt und in der Blotkammer auf einer Nitrocellulosemembran zwischen drei Lagen Transfer-Puffer-getränkten Filterpapiers eingebettet. Die beladene Blotkammer wurde für eine Stunde an eine Stromstärke von 0,04 A angeschlossen. Nach Ablauf des Blotvorganges wurde die nun mit Proteinen beladene Membran für 1h in 5% Magermilch-TBST inkubiert, um die nicht für eine Antikörperbindung gewünschten freien Proteinbindungsstellen abzusättigen. Dann wurde die Membran über Nacht bei 4°C in einer BSA-

Primärantikörperlösung inkubiert. Am nächsten Tag wurde die Membran zunächst mehrfach mit TBST-Waschpuffer gewaschen, um sie von nichtgebundenen Antikörpern zu säubern. Im Anschluss folgte eine einstündige Inkubation in einer 5% Magermilch-TBST-Sekundärantikörperlösung. So entstanden Primär-/Sekundärantikörperkomplexe. Die Sekundär-AK waren alle HRP-konjugiert. Die Visualisierung der Protein-AK-Komplexe erfolgte mittels verstärkter Chemielumineszenz nach Anleitung des Herstellers (HRP-Aktivierung der Chemielumineszenz). Das Signal wurde nach kurzem Kontakt (1-5min.) der Membran mit einem Röntgenfilm in einer mit Verstärkerfolien ausgekleideten Röntgenkassette sichtbar

TBST-Waschpuffer pH 7,4
12,11g Tris
17,53g NaCl
Rauchende Salzsäure 37% pH-Einstellung
0,1% Tween
<i>In Aqua bidest 2l</i>

2.2.8.3 Wiederaufbereitung der Membran

Die wie in 2.2.8.2 beschrieben hergestellte Membran ließ sich für weitere Untersuchungen verwenden. Mit einem speziellen Lösepuffer (Stripp-Puffer) wurden die Primär-Sekundärantikörperkomplexe von der Membran gelöst. Nach einer einstündigen Inkubation in diesem „Stripp-Puffer“, wurde die Membran mit TBST eine Stunde gewaschen, wobei der Waschpuffer mehrfach ausgetauscht werden muss.

Stripp-Puffer pH 7,4
10g TRIS
200ml 10% SDS-Solution
7ml β -Mercaptoethanol
Rauchende Salzsäure 37% pH-Einstellung

Anschließend konnte die Membran mit 5% Magermilch-TBST gesättigt und mit einem neuen Antikörper markiert werden.

Das Arbeiten mit dem „Stripp-Puffer“ sollte auf Grund des β -Mercaptoethanols unbedingt unter einem Abzug durchgeführt werden.

2.3 Statistisches Prozedere

Alle q-RT-PCR- und Proliferationsuntersuchungen wurden mit Hilfe von Microsoft Excel ausgewertet. Die Errechnung der p-Werte erfolgte mit dem ungepaarten t-Test und one-way ANOVA gefolgt von Bonferroni post hoc Analyse oder Dunetts multiple Comparison Test. Die Signifikanzwerte wurden als * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; *** $p < 0.001$ angegeben. Die Standardabweichungen und alle Auswertungen wurden mit Hilfe der GraphPad Prism Software (GraphPad Prism® Version 4.0 für Windows® Microsoft) durchgeführt. Alle qRT-PCR-Untersuchungen und Proliferationsassays wurden in dreifachen Ansetzungen in Triplikaten durchgeführt.

Die statistische Auswertung der Mikro-Array-Expressionsanalyse wurde von Herrn Opitz im Transkriptomanalyselabor Humanmedizin Göttingen nach o.g. Prozedere (2.2.5) durchgeführt.

Die Auswertung und Quantifizierung der Apoptoserate anhand der Zentrifugenpräparate erfolgte durch Auszählen der Gesamtzellzahl sowie dem Auszählen der apoptotischen Zellen in drei Gesichtsfeldern. Die Abbildung erfolgte als prozentualer Anteil der apoptotischen Zellen im Bezug auf die Gesamtzellzahl.

3 Ergebnisse

3.1 Valproinsäure hemmt das Tumorwachstum im TGCT-Mausmodell

Die in-vivo-Untersuchungen mit den athymischen Nacktmäusen wurden zum einen nach 75 Tagen (NTERA-2-tragende Mäuse), zum anderen nach 90 Tagen (TCam-2-tragende Mäuse) beendet (**Abb.8**).

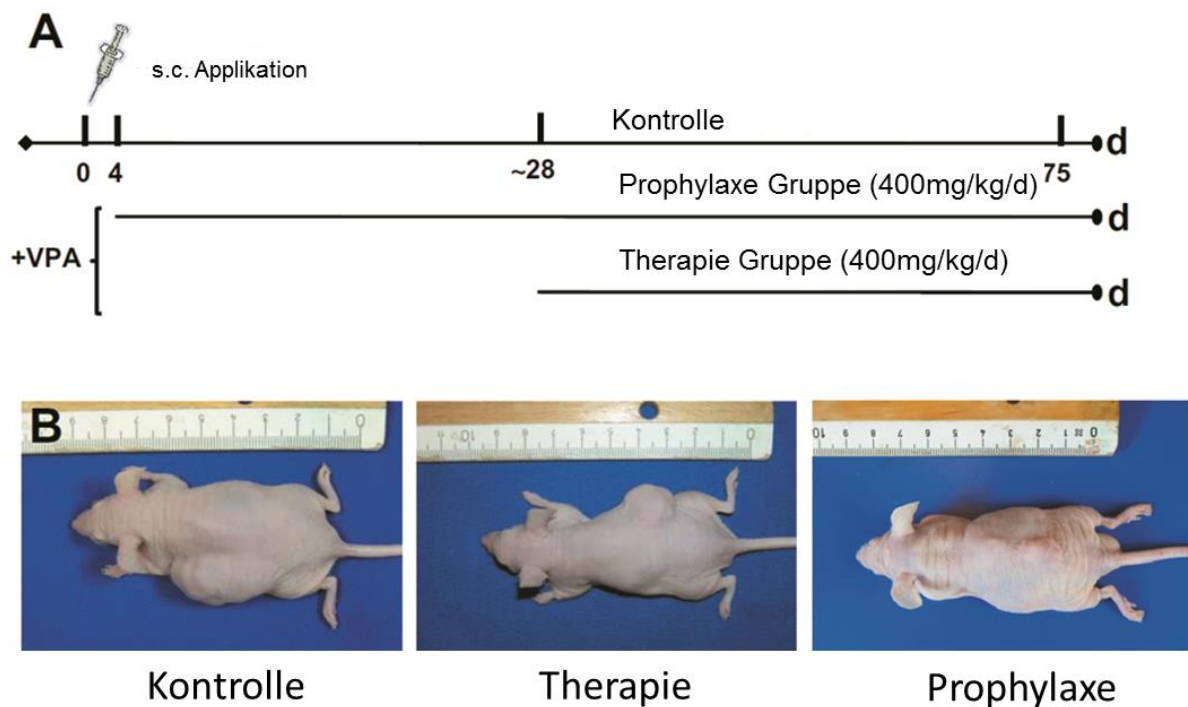


Abbildung 8: A: Tierversuchsaufbau. Nach der s.c.-Applikation der Zellen wurde die Prophylaxe-Gruppe sofort mit VPA (~400mg/kg/d) p.o. behandelt. Die Therapie-Gruppe wurde nach tastbarem Tumorwachstum (~28d) auf gleiche Weise behandelt. B: Mäuse der unterschiedlichen Gruppen mit entsprechenden s.c. Tumoren.

Die prophylaktisch behandelte Gruppe der NTERA-2 Mäuse zeigte eine Reduktion der Tumorgöße um $87 \pm 22.8\%$ bezogen auf die Kontrollgruppe, während sich die Tumorgöße der nach Tumorwachstum behandelten Mausgruppe um $61 \pm 28,3\%$ verringerte (**Abb. 9**). Die Behandlung der TCam-2-Zellen-tragenden Mäuse ergab keine signifikante Änderung der Tumorgöße (Daten nicht gezeigt). Hier zeigte sich allerdings ebenfalls eine Tendenz der wachstumsinhibierenden Wirkung von VPA.

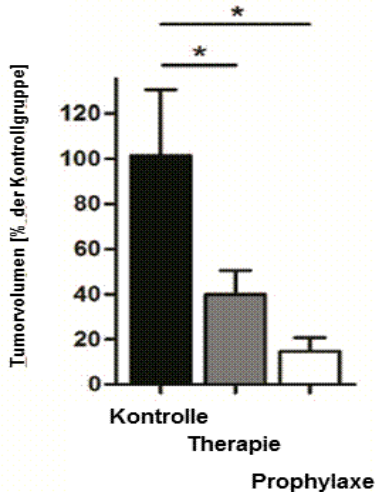


Abbildung 9: Tumorvolumen der NTERA-2-Xenograft-Mäuse. Unter VPA-Behandlung konnte sich eine signifikante Abnahme des Tumorvolumens sowohl in der nach Tumorwachstum behandelten Therapie-Gruppe als auch in der sofort nach Applikation behandelten Prophylaxe-Gruppe zeigen (Jeweils 15 Tiere in Kontroll-, Therapie- und Prophylaxegruppe). (Signifikanz * $p < 0.05$)

3.2 VPA-Wirkung auf Histonprotein-H3

Um zu verifizieren, ob VPA auch in TGCT zu einer Hyperacetylierung der Histonproteine führt, wurden aus den Zelllinien NTERA-2 und TCam-2 nukleäre Proteine extrahiert. Mittels Westernblot-Proteinanalytik konnte gezeigt werden, dass die Behandlung mit VPA in TGCT-Zelllinien zu einer Zunahme der acetylierten Form von Histonprotein-H3 bei konstanter Gesamtmenge führt und dieser Effekt dosisabhängig ist (**Abb.10**).

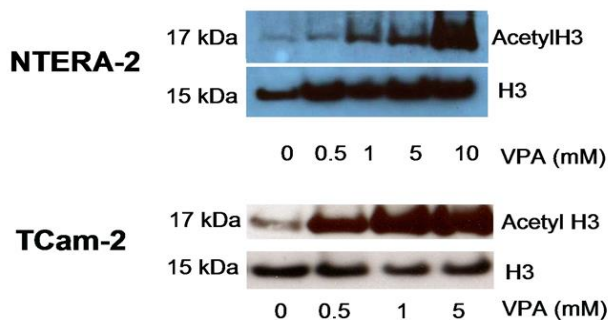


Abbildung 10: Expression von Histon-H3-Protein in TGCT-Zelllinien nach VPA-Behandlung (24h). Durch Westernblot-Analysen konnte in den TGCT-Zelllinien NTERA-2 und TCam-2 mit steigender VPA-Konzentration eine deutliche Zunahme der acetylierten Proteinform von H3 bei konstanter Gesamtproteinexpression nachgewiesen werden.

3.3 Mikroarray-Expressionsanalyse

Nachdem im Tierversuch deutliche antitumoröse Effekte durch VPA zu erkennen waren und in den Zelllinien NTERA-2 und TCam-2 die Histonacetylierung verifiziert werden konnte, untersuchten wir auf Genebene, welche differentielle Genveränderungen durch die VPA-Behandlung induziert werden. Um möglichst umfassend Veränderungen feststellen zu können, benutzten wir die Methode der Mikroarray-Expressionsanalyse.

Zunächst wurden die Zelllinien bzw. tumorspezifischen Expressionsmuster betrachtet und mit vorausgehenden Studien von Biermann et al. (2007), Eckert et al. (2008); Korkola et al. (2006), Loojienga (2008) und Skotheim et al. (2005) verglichen. Hierbei konnte eine hohe Konkordanz der Daten festgestellt werden.

Der Unterschied zwischen behandelten und nicht-behandelten Zellen wurde als „Fold Change“ abgebildet. Da die Untersuchungen der beiden Zelllinien nicht im gleichen Versuchsansatz erfolgten, dürfen die „Fold-Change“-Werte der Zelllinien nicht direkt miteinander verglichen werden. Es ist jedoch erlaubt die Tendenz (vermehrte, verminderte oder unterschiedliche Expression) miteinander zu vergleichen.

Die Analyse der Zelllinie TCam-2 ergab eine Kandidatenliste von 1810 differentiell-exprimierten Genen ($p < 0.05$; Fold Change > 2.0), wovon 526 Gene eine Veränderung des Fold Change-Wertes größer als drei zeigten ($p < 0.05$; Fold Change > 3.0). Für die Zelllinie NTERA-2 fanden sich 1061 Kandidaten-Gene ($p < 0.05$; fold change > 2.0). Von diesen wurden wiederum 258 entsprechend deutlich verändert exprimiert ($p < 0.05$; fold change > 3.0).

Es ergaben sich Übereinstimmungen im Expressionsmuster der beiden behandelten Zelllinien für 429 Gene.

Um einen Überblick über die Vielzahl von Genen zu erlangen, wurden die Gene funktionellen Gruppen zugeordnet. Für die Einteilung wurde von Herrn Opitz im Transkriptomanalyselabor Universität Göttingen die Ontologiekonsortiumdatenbank verwendet.

3.4 Mikroarray-Evaluation mittels q-RT-PCR

Um die Mikroarray-Ergebnisse zu evaluieren, wurden mittels q-RT-PCR-Analyse ausgewählte Gene betrachtet und mit den Mikroarray-Daten verglichen. Hierzu wurden je sieben Gene jeder Zelllinie betrachtet, welche unter Behandlung vermehrt

(Abb. 11A) oder vermindert (Abb.11B) exprimiert wurden. Alle evaluierten Gene konnten das Mikroarray-Ergebnis bestätigen.

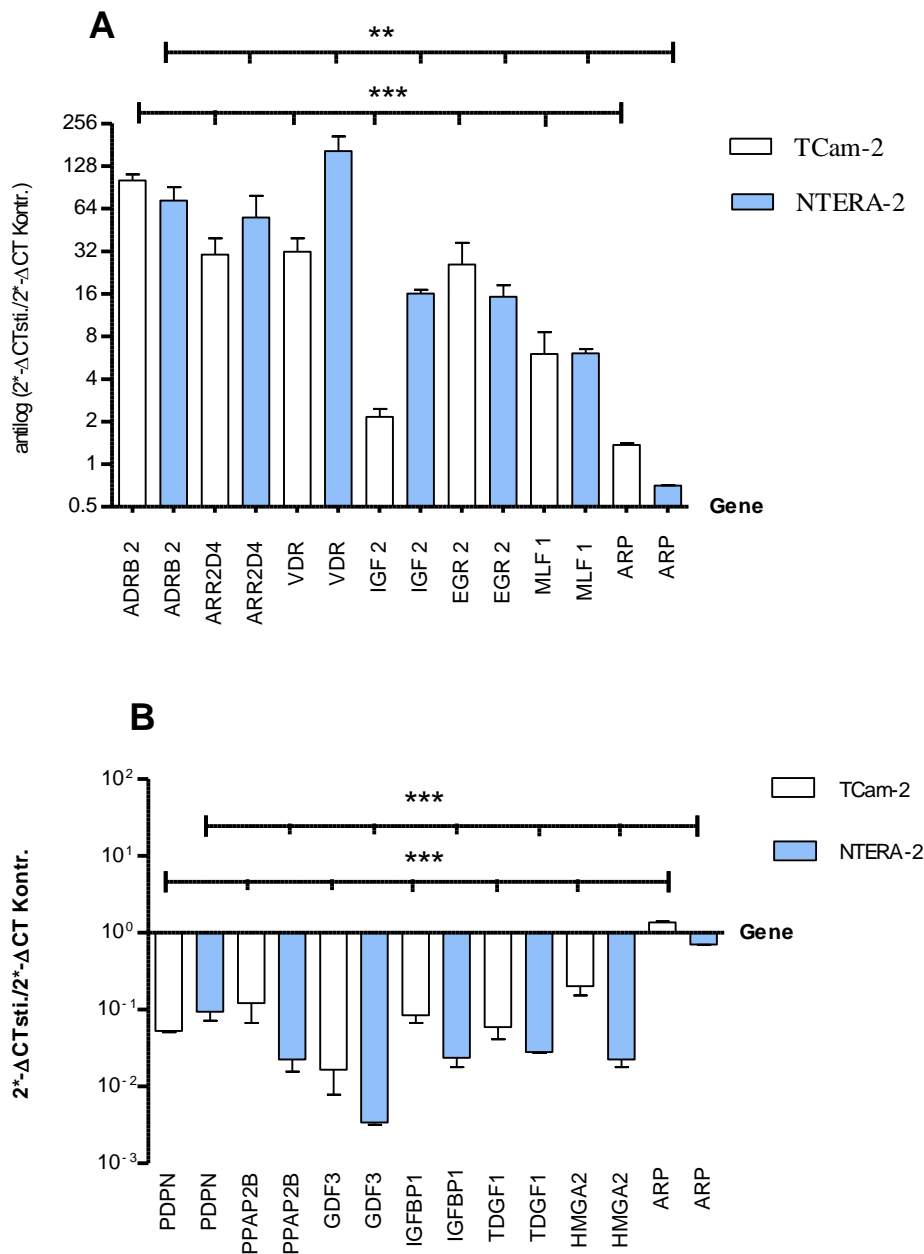


Abbildung 11: Microarray-Evaluation statistisch signifikant regulierter Gene der TGCT-Zelllinien NTERA-2 und TCam-2 nach VPA-Behandlung (5mM/24h). Mittels q-RT-PCR konnten in beiden TGCT-Zelllinien vermehrt (A) und vermindert (B) exprimierte Gene nachgewiesen werden. ARP (housekeeping gene). Signifikanz: ** < p 0.01; *** p < 0.001

3.5 VPA und Proliferation in TGCT

VPA konnte bereits in vielen Studien ein antitumoröses Potential zeigen. Hierbei wurde betrachtet, ob VPA über die Regulation der Proliferation eine Wirkung erzielt.

Zunächst konnten wir mittels eines Proliferationsassays eine signifikante konzentrationsabhängige Abnahme der Proliferationsaktivität und des Zellwachstums der Tumorzelllinien zeigen. **Abbildung 12** zeigt exemplarisch die Ergebnisse für die NTERA-2-Zelllinie. Hierbei wurde Valpromide, ein Valproinsäurederivat ohne HDACi-aktivität, als Negativkontrollsubstanz verwendet.

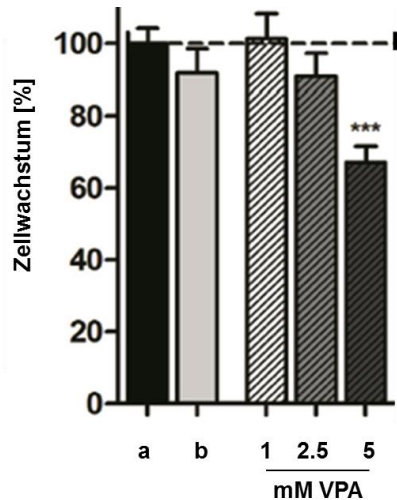


Abbildung 12: Proliferation der TGCT-Zelllinie NTERA-2 nach VPA-Behandlung.

Nach VPA-Behandlung (1, 2.5, 5mM) für 24h zeigt die TGCT-Zelllinie NTERA-2 eine konzentrations-abhängige Wachstumsinhibition (Venkataramani et al. 2012).

a: Kontrollzellen b: negativ Kontrolle mit VPM (2,5mM). Signifikanz: *** $p < 0.001$

In der Mikroarray-Expressionsanalyse ließen sich für die nicht-seminomatöse Zelllinie NTERA-2 49 ($p < 0.05$) proliferations-assoziierte, unter VPA-Behandlung differentiell exprimierte Kandidatengene beschreiben. Für die seminomatöse Zelllinie TCam-2 fanden sich unter gleicher Behandlung 72 Kandidatengene ($p < 0.05$). Eine Auswahl der Gene ist in **Abbildung 13 A u. B** dargestellt. Diese Gene wurden nochmals genauer in Rezeptor-assoziierte Gene und extrazelluläre Faktoren, Zellzyklus-assoziierte Gene und Transkriptionsfaktoren unterteilt.

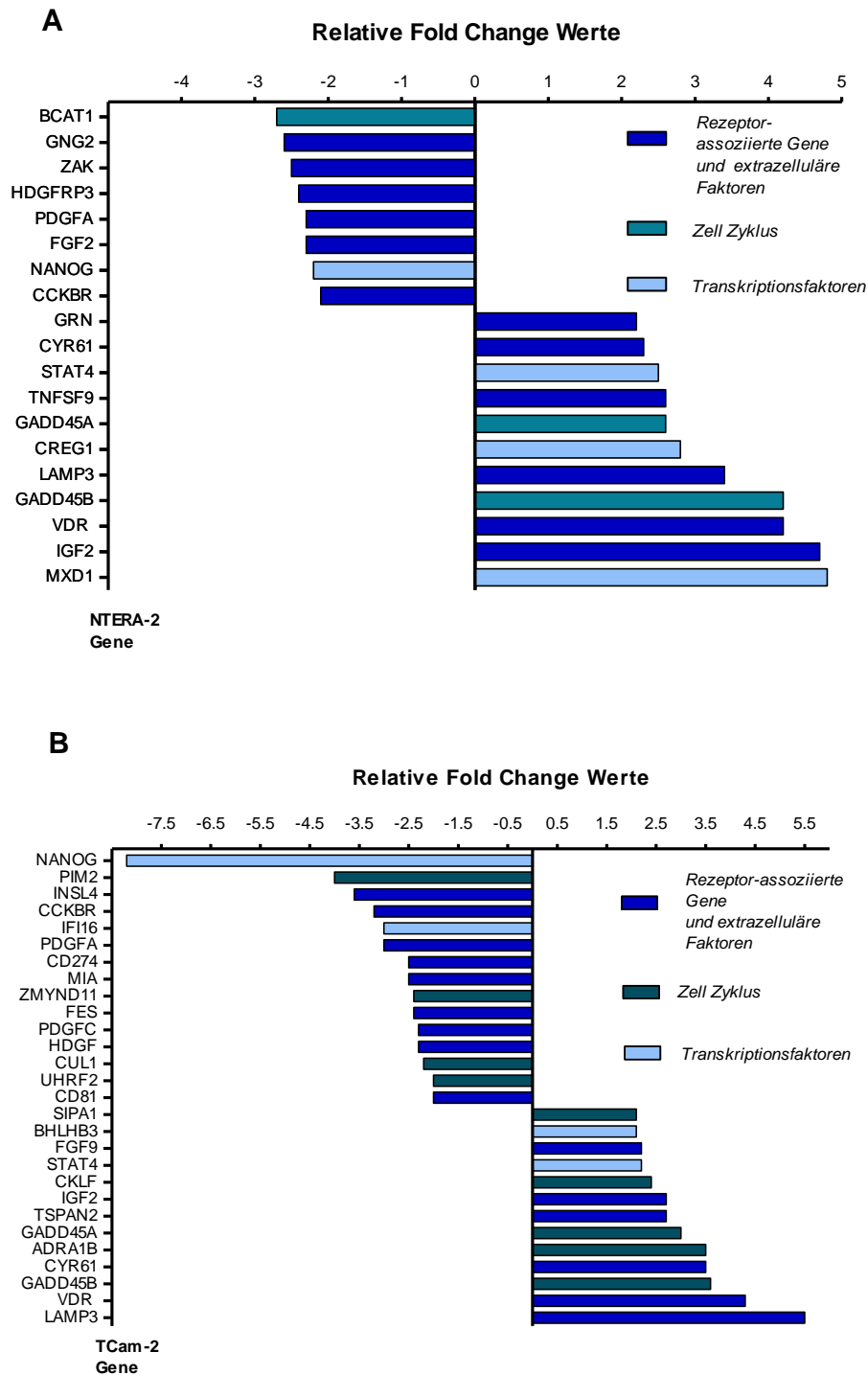


Abbildung 13: Differentielle Proliferations-assoziierte Genexpression in den TGCT-Zelllinien NTERA-2 und TCam-2 nach VPA-Behandlung (5mM/24h). A: NTERA-2-Zelllinie. B: TCam-2 Zelllinie.

3.6 VPA-induzierte Apoptose in TGCT

Die zytologischen Untersuchungen zeigten, dass VPA in der verwendeten Konzentration (5mM) und über 24h Behandlungszeit in den beiden TGCT-Zelllinien NTERA-2 und TCam-2 eine Caspase 3-vermittelte Apoptose induzierte (dargestellt anhand der seminomatösen Zelllinie TCam-2) (**Abb.14**).

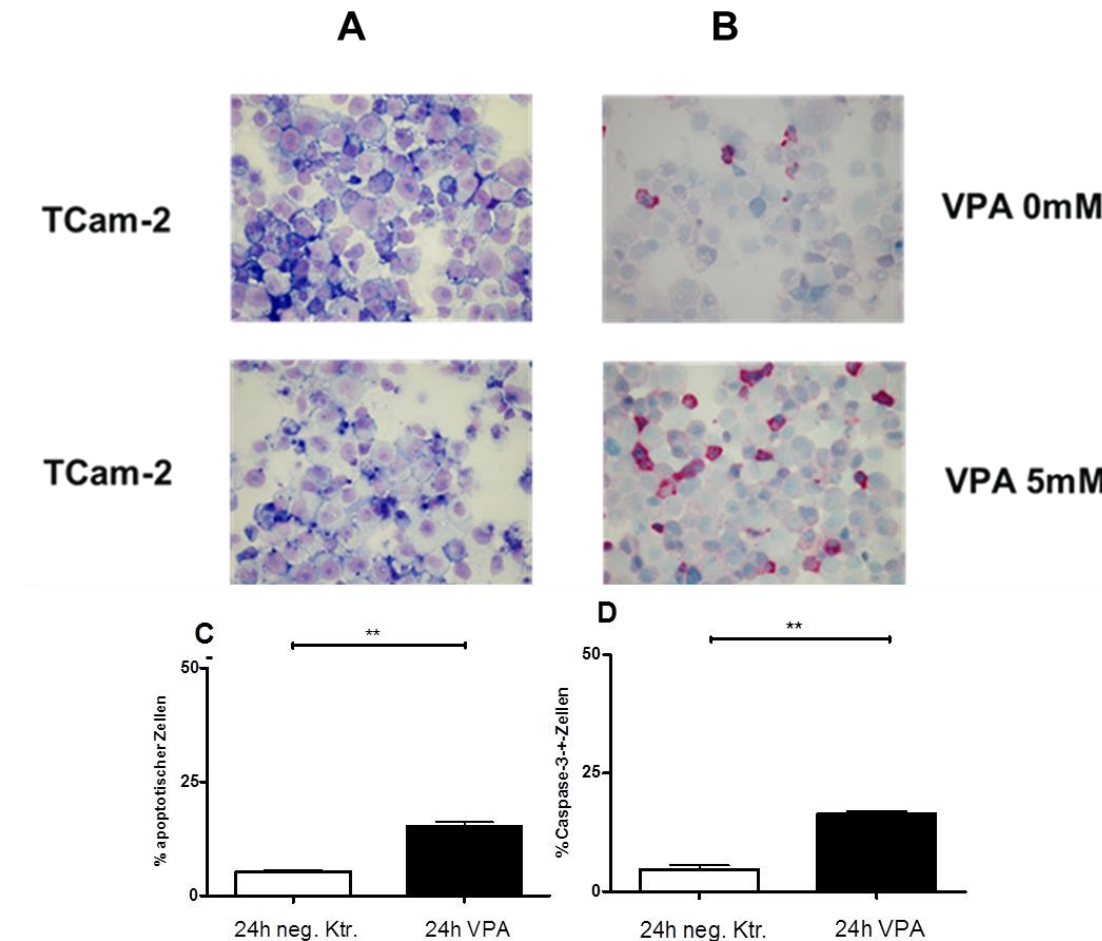


Abbildung 14: VPA-induzierte Apoptose in TGCT-Zelllinien. Giemsa-Färbung (A) und immunzytochemischer Nachweis der aktiven Form von Caspase-3 (B). VPA-Behandlung (5 mM, 24 h) der TGCT-Zelllinie TCam-2 Zunahme der Apoptoserate und Caspase-3-Aktivierung in der Tumorzelllinie. (A, B), Quantifizierung der Apoptoserate und Caspase-3-Aktivitätszunahme (C, D). Signifikanz: ** $p < 0.01$

Die durchgeführte Expressionsanalyse zeigte auf mRNA-Ebene eine differentielle Expression von Apoptose-assoziierten Genen. Für NTERA-2-Zellen fanden sich 60 Kandidatengene. Für TCam-2-Zellen entsprechend 65 Kandidatengene. Diese ließen sich sowohl der intrinsischen als auch der extrinsischen Apoptose-

Aktivierungskaskade zuordnen. Von besonderem Interesse war hierbei die Beobachtung, dass VPA die Expression des Resistenz-assoziierten Apoptose Kontrollgens CFLAR in beiden Zelllinien supprimiert (NTERA-2: -2.2 Fold Change, $p=0.0268$; TCam-2: -3.5 Fold Change, $p=0.0186$).

3.7 VPA induziert Differenzierung und verändert das Stammzellgenmuster in TGCT

EC und Seminome imitieren in ihrem Expressionsmuster bis zu einem bestimmten Grad embryonale Stammzellen (EC) oder primordiale Keimzellen (Seminom). Als diagnostische Marker und ebenso auf ihre mögliche Bedeutung in der Biologie der TGCT bezogen, spielen die so beschriebenen „Masterregulatoren der Pluripotenz“ NANOG, OCT-3/4 und SOX2 eine bedeutende Rolle (Looijenga 2009). Unter Behandlung mit VPA konnte eine verminderte Expression von OCT-3/4 und NANOG in beiden Zelllinien gezeigt werden (**Abb.15, Abb.16**). Auch auf Proteinebene konnte die in Weiterführenden Untersuchungen eine verminderte Expression für OCT-3/4 und NANOG bestätigt werden (Venkataramani et al. 2012). Das SOX2-Gen wurde in der EC-Zelllinie NTERA-2 signifikant supprimiert (**Abb.15, Abb. 16 A**), SOX17 entsprechend in TCam-2-Zellen (**Abb.15, Abb. 16 B**). In NTERA-2-Zellen gilt SOX17 zudem als Differenzierungsmarker und wurde interessanterweise unter VPA-Behandlung vermehrt exprimiert (**Abb.15, Abb.16 A**).

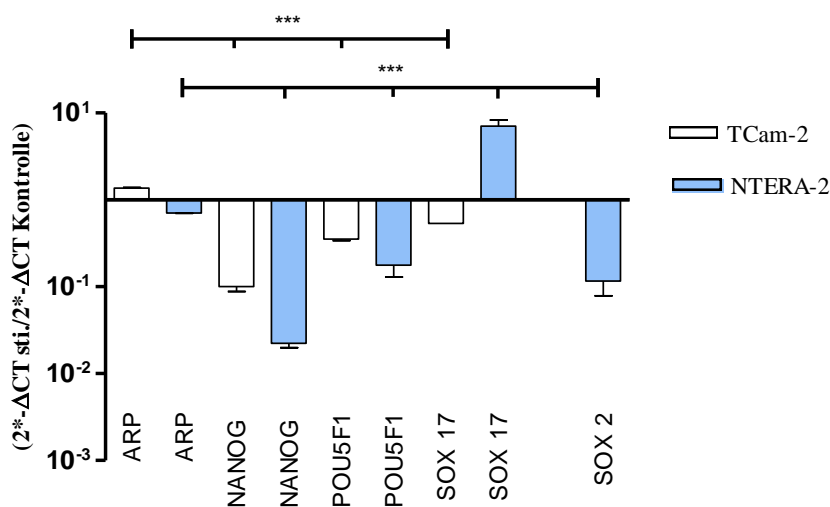


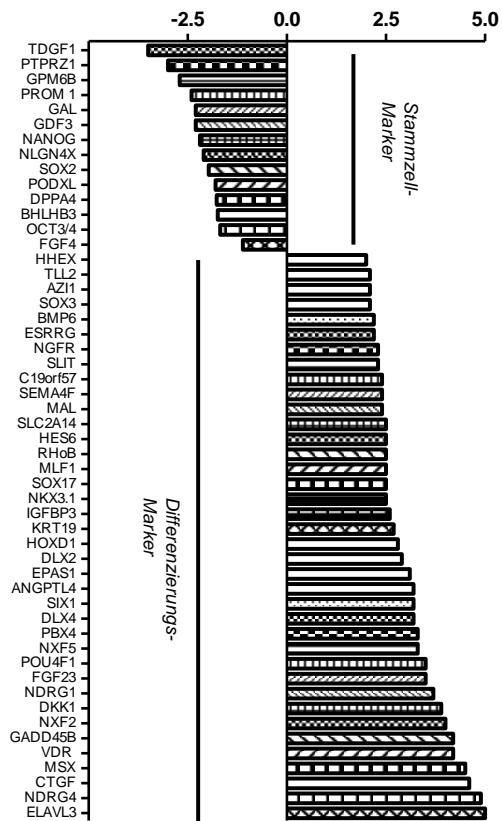
Abbildung 15: VPA-induzierte Änderung des Stammzellgenmusters in TGCT-Zelllinien. VPA-Behandlung (5mM/24h). Signifikanz: *** $p < 0.001$

VPA supprimierte neben OCT-3/4, NANOG und zelllinienabhängig SOX2 und SOX17 die Expression weiterer Stammzellmarker (z.B. GDF3, PODXL) in beiden Zelllinien (**Abb.16**). Hierunter fielen auch Zielgene der genannten Schlüsselregulatoren wie z.B. TDGF1.

Der Suppression der Stammzellmarker stand in beiden Zelllinien die vermehrte Expression von Differenzierungsmarkern unter VPA-Behandlung gegenüber (**Abb.16**). Hierbei wurden in NTERA-2-Zellen sowohl mesodermale (z.B. IGFBP3), ectodermale (z.B. NGFR) als endodermale Marker (z.B. SOX17) vermehrt exprimiert (**Abb.16 A**).

Nettersheim et al. (2011) zeigten, dass TGF- β 1, EGF und FGF4 in der seminomatösen TGCT-Zelllinie TCam-2 Differenzierung induzieren kann. Hierbei entstand ein trophoektodermaler Zelltyp. TCam-2-Zellen exprimierten durch VPA-Behandlung die von Nettersheim aufgeführten trophoektodermalen Marker TEAD1 und GATA 6 vermehrt (**Abb.16 B**). Die drei Faktoren induzierten hierbei einen Block des BMP-, eine Aktivierung des Hippo- sowie eine Inhibition des LIN28/BLIMP1-Signalwegs. Unsere Untersuchungen konnten zeigen, dass sich durch VPA, der Wirkung von TGF- β 1, EGF und FGF4 entsprechend, die genannten Signalwege beeinflussen könnten. So zeigten sich nach 24h Behandlung mit 5mM VPA die Gene BLIMT1 (-1.45 Fold Change, $p = 0.013$), YAP1 (-2.32 Fold Change, $p = 0.04$) und SMAD1 (-1.6, $p = 0.024$) in der Mikroarray-Expressionsanalyse vermindert exprimiert.

A



B

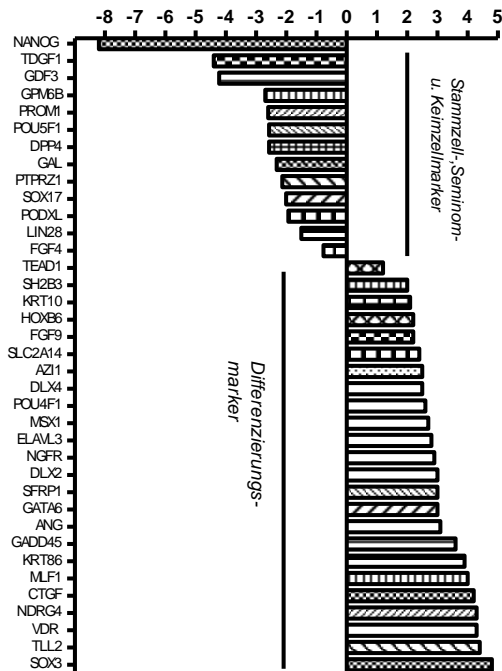


Abbildung 16: VPA-induzierte Expressionsänderung von Stammzellmarkern in TGCT-Zelllinien. VPA-Behandlung (5mM/24h). A: NTERA-2-Zelllinie. B: Tcam-2-Zelllinie.

4 Diskussion

Diese Dissertation befasst sich mit der Wirkung von Valproinsäure, einem HDACi, auf maligne Keimzelltumoren des Hodens.

In unseren Untersuchungen konnten wir zeigen, dass der HDACi Valproinsäure *in vivo* (im Nacktmausmodell) zu einer Tumorreduktion und Wachstumsinhibition von TGCT führt.

Es konnte gezeigt werden, dass VPA, entsprechend der Wirkung auf andere Tumorentitäten, *in vitro* eine Änderung des epigenetischen Musters, genauer eine Hyperacetylierung der Histonproteine zur Folge hatte.

In der Mikroarray-Analyse fanden sich eine differentielle Expression von 1061 Genen (NTERA-2-Zellen) und 1810 Genen (TCam-2-Zellen) unter VPA-Behandlung.

Um die antitumorösen Eigenschaften erklären zu können, betrachteten wir genauer die Wirkung von VPA auf die proliferativen Eigenschaften der TGCT-Zelllinien sowie den Effekt auf den programmierten Zelltod.

Der antiproliferative Effekt von VPA konnte im Proliferationsassay bestätigt werden, es fanden sich in der Mikroarray-Analyse eine Vielzahl von Proliferations-assoziierten, unter VPA-Behandlung differentiell exprimierten Genen.

Apoptose-assoziierte Gene wurden ebenfalls deutlich in der Expression verändert. Als weiteren Prozess betrachteten wir, ob VPA eine Auswirkung auf die Differenzierung der TGCT-Zelllinien besitzen würde. Auch hier fanden sich einige Kandidatengene in ihrer Expression verändert. In diesem Kontext fiel besonders die veränderte Expression der bekannten Stammzellmarker OCT-3/4, NANOG und der SOX-Familie auf.

4.1 Die Wirkung von VPA auf TGCT *in-vivo* im Vergleich zu anderen soliden Tumorentitäten

Bereits im Jahr 1992 wurde von Tittle und Schaumann die wachstumsverlangsamende Wirkung von VPA auf mehrere lymphatische Tumorzelllinien beschrieben (Tittle und Schaumann 1992), während Cinatl et al. (1996) die antitumoröse Aktivität von VPA auf Neuroblastom-Zellen zeigen konnte (Cinatl et al. 1996).

Im Jahr 2001 beschrieben dann Göttlicher et al. VPA als Wirkstoff der Gruppe HDACi und zeigten seine antitumoröse Wirkung auf akute myeloische Leukämiezellen.

In den letzten Jahren bestätigte sich in weiteren Studien das antitumoröse Potential von VPA.

Als Monotherapie zeigte es analog zu unseren Daten eine gute Wirksamkeit auf Fibrosarkomzellen, Prostatakarzinom-Zelllinien und im Prostatakarzinom-in-vivo-Modell. Des Weiteren auf Mammakarzinomzellen und Medulloblastomzellen in-vitro und in-vivo (Chavez-Blanco et al. 2006, Olsen CM et al. 2004, Thelen et al. 2004) Untersuchungen an Blasentumormodellen zeigten, dass VPA eine Invasions-Inhibition bewirken kann (Chen et al. 2006). 2013 bestätigte sich der antitumoröse Effekt von VPA auch auf Nicht-kleinzellige-Lungenkarzinom-Zelllinien (NSCLC) und im NSCLC-Tumormausmodell. Die Wirkung potenzierte sich in Kombination mit P276-00 einem neuen Cyclin-abhängigen-Kinase-Inhibitor (Shirsath et al. 2013).

Einen weiteren Interessanten Ansatz untersuchten Li et al. 2013. Sie konnten eine synergistische Wirkung von VPA mit dem oncolytischen Ratten-Parvovirus H1-PV auf duktales Pankreaskarzinom-Zelllinien und Tumormausmodelle zeigen (Li J et al. 2013).

Nicht nur wie in der Studie von Shirsath et al. (2013) sowie Li et al (2013) erneut bestätigt entfaltet VPA einen stärkeren antitumorösen Effekt in Kombination mit epigenetisch wirkenden Substanzen oder spezifischen Target-Therapien, wobei VPA die Tumorzellen auf unterschiedlichste Weise sensibilisiert und attackiert.

Auch bzw. gerade in Kombination mit Standardchemotherapeutika zeigten sich interessante Ergebnisse.

2010 zeigten Hubaux et al. an kleinzelligen Lungenkarzinom-Zelllinien (SCLC) und im Tumormausmodell eine verbesserte Wirksamkeit der Erstlinienchemotherapie-kombination Etoposid/Cisplatin. Hierbei konnte in einer Mikroarray-Analyse unter anderem eine VPA-induzierte Wirkung auf Etoposid/Cisplatin-Resistenz-assoziierte Gene wie Bcl-xL nachgewiesen werden (Hubaux et al. 2010).

Chavez Blanco et al. (2006) konnten eine Wirkungssteigerung der Tumortoxizität von Gemcitabine, Cisplatin und Adramycin durch VPA kombiniert mit Hydralazin (einem DNA-Methylierungs-Inhibitor) anhand von Zervixkarzinom- und Fibrosarkomzellen darstellen. Im Fibrosarkom-Mausmodell erhöhte sich ebenfalls die Toxizität von Adramycin durch die Kombinationsbehandlung mit den beiden Substanzen (Chavez-Blanco et al. 2006).

Weitere Studien befassten sich mit dem gleichen Modellansatz und konnten ebenfalls eine jeweilige Wirkungssteigerung der getesteten Chemotherapeutika durch VPA oder eine Kombination von epigenetisch wirkenden Substanzen nachweisen. Hier sind die Untersuchungen an Kolonkarzinom-Zellen, Mamma-karzinom-Zelllinien, hepatozellulären-Karzinomzellen, Glioblastomen und ana-plastischen Schilddrüsentumoren zu nennen (Catalano et al. 2006; Catalano et al. 2009; Das et al. 2007; Friedmann et al. 2006; Hodges-Gallagher et al. 2007; Mongan und Gudas 2005; Pathil et al. 2006; Venturelli et al. 2007).

Durchgeführte klinische Phase-I- und –II-Studien lieferten divergente Ergebnisse. So konnten positive Effekte in der neoadjuvanten Kombinationstherapie von Mamma-karzinom-Patientinnen im fortgeschrittenen Stadium, mit VPA in Kombination mit Hydralazin, Doxorubicin und Cyclophosphamid beschrieben werden, welche die Planung einer Phase-II- Studie ermöglichte (Arce et al. 2006). Die Gabe von VPA in Kombination mit Doxorubicin und Interferon- α bei malignen Melanomen führte allerdings zu starken Nebenwirkungen und zu keinem Wirkungsvorteil gegenüber der Standardtherapie (Rocca et al. 2009). Eine weitere Phase-I-Studie untersuchte die Verträglichkeit von VPA bei pädiatrischen Patienten mit therapierefraktären soliden Tumoren und ZNS-Tumoren (Su et al. 2011). Hier zeigte sich eine tolerable Nebenwirkungsrate die weitere Studien mit Chemotherapiepartnern erlauben.

Tesei et al. (2012) beschäftigten sich mit Schwefel-Derivaten von VPA und Ihre Wirkung auf NSCLC-Zelllinien. Betrachtet wurde die antitumoröse Wirkung der Schwefelderivate, da die herkömmliche VPA in relativ hohen Dosen verwendet werden musste um klinisch einen Effekt nachweisen zu können. Die Schwefelderivate zeigten eine ähnliche Wirkung wie VPA bereits in geringeren Dosen. Insbesondere zeigte sich ein gutes Ansprechen der Tumorzelllinien in Kombination mit Cisplatin. Hierbei konnten auch geringere Konzentrationen des Standardchemotherapeutikums verwendet werden (Tesei et al. 2012).

Die Liste der bereits durchgeführten Studien verdeutlicht, welches Potential ein epigenetisch wirkendes Medikament wie VPA oder dessen Derivate, sowie die Kombination mit Chemotherapeutika und neuen Targettherapien besitzt. Unsere In-vivo-Untersuchungen zeigen, dass VPA auch für die Therapie von TGCT von Interesse sein könnte. Die durchgeführten Untersuchungen dürfen als erste Tendenz interpretiert werden. In Zukunft sollten weitere Untersuchungen mit Kombinations-

behandlungen zur Wirkungsverstärkung ins Auge gefasst werden. Ziel kann, wie von Tesei et al. (2013) gezeigt, eine Toxizitätsverminderung oder noch bessere Wirksamkeit der Standardchemotherapie bzw. Strahlentherapie sein. Ob sich für Patienten, deren TGCT Resistenzen gegen die Standardchemotherapie zeigen, eine Verbesserung erzielen lässt gilt es ebenfalls zu untersuchen.

4.2 VPA-induzierte Hyperacetylierung von Histonproteinen in TGCT

Veränderte Gentranskription, welche auf epigenetischen Veränderungen wie Histondeacetylierung oder DNA-Promotormethylierung beruhen, findet sich gehäuft während der molekularen Pathogenese von malignen Prozessen (Zhu und Otterson 2003). Der Prozess der Gentranskription ist stark reguliert. Obwohl es eine Vielzahl von Regulationsmechanismen gibt, so steht über diesen doch der Organisationszustand des Chromatins. Dieser schafft die Voraussetzung, Transkriptionsfaktoren, Regulationsproteinen und RNA-Polymerasen Zugang zu bestimmten Promotorregionen zu verschaffen und hier die Gentranskription zu aktivieren (Lee und Young 2000). Epigenetisch-wirkende Medikamente wie HDACis und demethylierende Wirkstoffe erzielen genau hier ihre Wirkung. Unsere Untersuchungen zeigten, dass VPA auch in TGCT das Acetylierungsmuster von Histonen verändert. Die anschließende Expressionsanalyse bestätigte ebenfalls unsere Vermutung, dass viele Gene auf mRNA Ebene in ihrer Expression beeinflusst werden.

4.3 VPA und Proliferation in TGCT

In vielen Malignomen ist bekannt, dass über Aktivierung oder Mutationen von Proto-onkogenen und Tumorsuppressoren das normale Proliferationsverhalten in diesen Zellen gestört wird. So spielt bekannterweise eine Mutation von APC bei der Entstehung des Dickdarmkarzinomsyndroms FAP (Familiäre adenomatöse Polyposis Coli) eine entscheidende Rolle. Defekte oder Mutationen von weiteren bekannten Tumorsuppressoren wie dem Retinoblastomprotein und TP53 (Tumor Protein 53) sind ebenfalls wichtige Faktoren in der Pathogenese von Malignomen und bewirken Störungen des normalen Zellzyklusablaufs. Den genannten Faktoren lassen sich noch weitere hinzufügen. In Keimzelltumoren sind die genauen Entstehungsgründe noch nicht bekannt. TP 53 liegt in den meisten Keimzelltumoren als unmutierte Wild-

typvariante vor (Kersemaekers et al. 2002; Masters und Koberle 2003). Die Vermutung, eine Veränderung von TP 53 könnte für die mögliche Resistenz vereinzelter TGCT gegenüber Platinderivaten verantwortlich sein, konnte nicht bestätigt werden (Kersemaekers et al. 2002).

Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass HDACi eine Re-Expression von Tumorsuppressorgen bewirken und hierüber die Proliferation beeinflussen können (Marks et al. 2000; Melnick und Licht 2002; Vigushin und Coombes 2002). Hierbei spielen jedoch nicht nur die direkte Wirkung auf die Transkription der Suppressoren eine Rolle sondern ebenfalls die Beeinflussung weiterer Modulatoren wie die zyklin-abhängigen-Kinase-Inhibitoren. VPA beeinflusst die Expression von p21WAF1/CDKN1A (Cheng et al. 2007). Dieses Protein ist ein potenter Inhibitor des Zyklin-CDK2-oder -CDK4-Komplexes. Da es streng durch TP53 reguliert wird, steuert es so den TP53-kontrollierten Fortgang des Zellzyklus am G1-Kontrollpunkt. In AML-Zelllinien wurde die p21-Expression nicht TP53- sondern c-Myc-abhängig reguliert. Unter VPA-Behandlung kam es zu einer verminderten Expression von c-Myc. Durch diese Suppression wurde vermehrt p21 exprimiert und die Zellen in G1-Arrest versetzt. Durch Versuche mit Zellen, welche eine ektope c-Myc-Expression besaßen, konnte die regulatorische Funktion von c-Myc in der p21-Expression belegt werden. VPA konnte eine ektope c-Myc-Expression nicht beeinflussen, gleichzeitig blieb eine Änderung der p21-Expression aus. In primären AML-Zellen konnte ebenfalls der antiproliferative Effekt über c-Myc-Expressionsveränderung gezeigt werden (Cheng et al. 2007). Dem Stammzellcharakter von Keimzelltumoren ähneln sowohl die untersuchten hämatologischen Erkrankungen als auch weitere solide Malignome. So konnten mit VPA in Medulloblastomzelllinien ebenfalls vielversprechende Ergebnisse erzielt werden. Konkordant zu den Ergebnissen in AML-Zelllinien induzierte VPA Zellzyklus-Arrest über die Regulation von p21 und c-Myc. P16 INK4a, ein weiteres CDK-Inhibitor-Protein, wurde durch VPA nicht reguliert. Auf eine supratentoriale primitive neuroektodermale Tumorzelllinie hatte VPA keinen Effekt (Li XN et al. 2005).

Überraschenderweise konnte VPA in unserem Versuchsansatz mit TGCT keine Veränderung der p21- oder c-Myc-Expression bewirken. Dennoch entfaltete VPA einen antiproliferativen Effekt in beiden Zelllinien. Unter den vielen, durch VPA

differentiell exprimierten, mit Zellwachstum-assoziierten Genen, fanden sich einige Kandidatengene die den antiproliferativen Effekt begründen könnten.

So wurden in beiden Zelllinien die Zellzyklus-kontrollierenden Growth Arrest and DNA Damage A- und B-(Gadd 45 A und B) Gene unter VPA-Behandlung vermehrt exprimiert (**Abb.13**). Die Proteine gelten als Sensoren der Zelle auf genotoxischen und physiologischen Stress, regulieren den Zellzyklus, können proapoptotisch und auf die Differenzierung der Zelle wirken. Sie sind zudem beteiligt an der DNA-Reparatur. Hierbei modulieren Gadd 45 A und B die Aktivität und Expression verschiedener Gene. Jin et al. (2000) zeigten, dass Gadd 45 besonders über die Inhibition von CDC-2 auf den Zellzyklus Wachstums-inhibierend wirkt (Jin et al 2000). Die Expression und Aktivität der Gadd 45-Gene kann sowohl p 53-abhängig als auch -unabhängig reguliert werden. VPA scheint p53-unabhängig die Gadd 45-Expression in TGCT zu verändern. Die wichtige Rolle von Gadd 45-Genen wird durch die Beobachtungen von Na et al. (2010) an SCLC unterstrichen. Hier wurde der Zusammenhang einer Gadd 45-Suppression in SCLC bei der Tumorentstehung beschrieben (Na et al. 2010). Tront et al. (2006) untersuchten die Rolle von Gadd 45 in Mammakarzinomzellen, wo ein Verlust der Gene mit der Tumorentstehung in Verbindung gesetzt wurde (Tront et al. 2006). Die Ergebnisse unserer Untersuchung legen nahe, dass die veränderte Expression der Gadd 45-Gene eine wichtige Rolle beim antiproliferativen Effekt von VPA in TGCT des Hodens spielt.

In Zukunft könnte eine weitere Beobachtung von Interesse sein. Bremmer et al. konnten zeigen, dass Vitamin D3 zu einer vermehrten Expression von Gadd 45 führt (Bremmer et al. 2012). Da VPA in TGCT des Hodens sowohl Gadd 45 als auch den Vitamin-D-Rezeptor (VDR) in der Expression verstärkt (**Abb.13**), wäre die Untersuchung einer Kombinationsbehandlung interessant.

Auch die differentielle Expression von verschiedenen Wachstumsfaktoren scheint einen wichtigen Beitrag zum antiproliferativen-Effekt von VPA zu liefern. Wobei diese Faktoren ähnlich wie Gadd 45 die Differenzierung der Zellen beeinflussen können. VPA modifiziert die Regulation von Mitgliedern der Familie der Fibroblasten-Wachstums-faktoren (FGF), epidermalen Wachstumsfaktoren (EGF), Platelet-derived Growth Factor Familie (PDGF) und Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren (IGF). Das System der Insulin-ähnlichen Wachstumsfaktoren stimuliert die Proliferation in Prostata-Adenom-Zellen (Cohen et al. 1994). Thelen et al. (2004)

konnten die Wirkung von VPA auf das IGF-System zeigen und hierdurch den antiproliferativen Effekt von VPA auf Prostatakarzinomzellen erklären (Thelen et al. 2004).

Eine weitere Beobachtung stellt die Suppression des Gen BCAT1 (branched chain amino-acid transaminase 1) in der EC-Zelllinie NTERA-2 dar (**Abb.13A**). Das BCAT1- Gen liegt auf dem kurzen Arm des Chromosom 12 und wurde von Korkola et al. (2006) als ein mögliches Kandidatengen in der Transformation der IGCNU/-Seminom-Läsion zum EC beschrieben, da es nur in EC exprimiert wird (Korkola et al. 2006). Zhou et al. (2007) konnten zeigen, dass eine Suppression des Gens in Nasopharynxkarzinom-Zellen stark antiproliferativ wirkt (Zhou et al. 2007). In einer weiterführenden Studie von Zhou et al (2013) wurde postuliert, dass eine Überexpression von c-Myc die BCAT1-Überexpression auslöst. Diese ist verantwortlich für die Proliferation, Migration und Invasion in Nasopharynxkarzinom-Zellen. Dies spricht für die These, dass die Suppression von BCAT1 durch VPA auch in Nicht-Seminomen einen antiproliferativen Effekt zur Folge haben kann. Die genaue Rolle von BCAT1 in TGCT ist allerdings noch nicht geklärt.

4.4 VPA und Apoptose in TGCT

VPA wirkt nicht nur antiproliferativ sondern auch Apoptose-induzierend.

Dabei können sowohl Faktoren des intrinsischen als auch extrinsischen Systems eine Rolle spielen. Schuchmann et al. (2006) zeigten, dass VPA über den extrinsischen Weg mit Beteiligung der Caspase-8-abhängigen Kaskade Apoptose in Zelllinien eines hepatozellulären-Karzinoms induziert. Genauer sensibilisiert VPA über die vermehrte Expression der Death-Rezeptoren-4 und -5 die Tumorzellen für die TRAIL/Apo2L-(Tumornekrosefaktor (Ligand) Superfamilie, Mitglied-10) vermittelte Apoptose. Wenn die Faktoren TRAIL/Apo2L fehlen, kann VPA die Expression von antiapoptotischen Faktoren des intrinsischen und extrinsischen Systems vermindern. Hier seien c-Flip-Proteine genannt, welche mit DISC und BCL-2/BCL-x assoziiert sind. Wurden Tumorzellen gleichzeitig mit VPA und TRAIL/Apo2L stimuliert, kam es zu einer Zunahme der Apoptoserate und einer vermehrten Caspase-3-Aktivität. Selbst in TRAIL-resistenten Tumoren konnte VPA eine Sensibilisierung der Tumorzellen gegenüber TRAIL bewirken. Diese Ergebnisse konnten in AML, CLL, Lungenkarzinom-Zelllinien und in anaplastischen Schilddrüsenkarzinom-Zelllinien

bestätigt werden (Cha et al. 2013, Iacomino et al. 2008; Lagneaux et al. 2007; Pathil et al. 2006; Schuchmann et al. 2006; Ziauddin et al. 2006). Angelucci et al. (2006) konnte zeigen, dass eine längere Behandlung von Prostatakarzinom-Zellen zu einer Zunahme der Fas (TNF receptor superfamily, member 6) /Fas Ligand-abhängigen Apoptose mit vermehrter Expression beider Faktoren führte (Angelucci et al. 2006).

In unseren Versuchen führte eine Behandlung der TCGT_Zelllinien mit VPA zu einer vermehrten Caspase 3-abhängigen Apoptose (**Abb.14**). Thelen et al. (2004) beschrieben für die Stimulation mit VPA über 7h einen ausbleibenden morphologischen Effekt (Caspase-3- Färbung) in Prostatakarzinom-Zellen. Eine längere Stimulation bis 36h führte zu einer deutlichen Aktivitätszunahme der Caspase-3 (Thelen et al. 2004). In undifferenzierten Schilddrüsentumor-Zellen konnte eine deutliche Zunahme der Caspase-3-Aktivität nach 48h bis zu 96h beobachtet werden (Catalano et al. 2006). Da sich auf mRNA-Ebene in unseren Untersuchungen Veränderungen apoptose-assoziiierter Gene nach 24h fanden und eine vermehrte Aktivierung der Caspase-3 zu beobachten war, lässt sich auch in TGCT der Apoptose-induzierende Effekt von VPA verdeutlichen.

Auch in TGCT-Zelllinien könnte in Zukunft das durch VPA supprimierte Gen CFLAR (c-Flip) von Interesse sein. CFLAR inhibiert die Aktivierung von verschiedenen Caspasen und führt so zu Apoptose-Inhibition (Dutton et al 2006; Longley et al. 2006; Luo et al. 2008; Yang JK 2008). Ein CFLAR-Knock-Out in Prostatakarzinom-Zelllinien führte zu einer verstärkten Apoptoserate, die durch Kombinationsbehandlung mit Doxazosin verstärkt wurde (Kim et al 2013). Interessanterweise wurde das Gen gehäuft in Analysen von Proben platinresistenter Patienten nachgewiesen (Korkola et al. 2009). Die sehr platinresistente Zelllinie TCam-2 exprimiert ebenfalls vermehrt CFLAR. In EC-Zelllinien kann die vermehrte Expression von CFLAR zu einer stärkeren Platinresistenz führen (Spierings et al. 2003).

4.5 VPA induziert Differenzierung und verändert das Stammzellgenmuster in TGCT

Seminom-Zellen sind undifferenziert und erscheinen als das maligne Korrelat primordialer Keimzellen. Nicht-Seminome können hingegen in verschiedenen histologischen Varianten erscheinen. Dabei können die undifferenzierten pluripotenten EC-Zellen sowohl in Teratome, mit Anteilen aller drei Keimblätter, als auch

in extra-embryonalem-Gewebe-entsprechende Dottersacktumoren oder Chorionkarzinome differenzieren. Interessanterweise ähnelt die Entwicklung der Nicht-Seminome der frühen Embryogenese. So besitzen die EC-Zellen viele Eigenschaften von Zellen der Inneren-Zellmasse bzw. embryonalen Stammzellen (Henderson et al. 2002). Auf Transkriptionsebene bedeutet dies die Expression der Stammzellfaktoren NANOG, OCT-3/4 und SOX2. Sie nehmen einen wichtigen Platz in der Regulation der Transkription und dem Erhalt der Pluripotenz in embryonalen Stammzellen ein (Boyer et al. 2005). Mit zunehmenden Grad der Differenzierung werden diese Faktoren nicht mehr exprimiert. In Seminomen werden mit Ausnahme von SOX2, NANOG und OCT-3/4 exprimiert (Sperger et al. 2003). Man vermutet auch für die beiden TGCT-Typen Seminom und EC, dass diese Faktoren eine wichtige regulatorische Funktion einnehmen. In mehreren Tumorentitäten wurden vergleichbare, embryonalen-Stammzellen-zuzuordnende Expressionsmuster beschrieben und Verbindungen zwischen der Expression und den histopathologischen Merkmalen hergestellt. Diese sind in vielen Malignomen mit einer schlechten Prognose assoziiert (Ben-Porath et al. 2008). In unserer Untersuchung konnten wir zeigen, dass VPA die Expression der Stammzellfaktoren NANOG und OCT-3/4 auf mRNA- und Protein-Ebene in TGCT-Zelllinien signifikant supprimiert. SOX-2 wurde auf mRNA Ebene in der EC-Zelllinie NTERA-2 ebenfalls signifikant supprimiert.

Das NANOG-Gen (NANOG homeobox) kodiert für ein 305 Aminosäuren großen Transkriptionsfaktor. Das Allel liegt interessanterweise auf Chromosom 12p13.31, dem in Keimzelltumoren fast immer zusätzlich vorhandenen kurzen Arm des Chromosoms-12. Der Transkriptionsfaktor besitzt ein stark konserviertes Homöodomänen-Motiv, welches die Bindung der RNA-Polymerase an die DNA erleichtert. NANOG spielt wie erwähnt eine wichtige Rolle in der Regulation der Pluripotenz von Zellen der inneren Zellmasse während der embryonalen Entwicklung (Chambers et al. 2003). Ohne die Expression von NANOG differenzieren sich embryonale Stammzellen von Mäusen in viszerales und parietales Endoderm. In humanen embryonalen Stammzellen führt die Überexpression von NANOG zum verlängerten Anhalten des pluripotenten Zustandes. Demgegenüber führt hier ein „knock out“ des Transkriptionsfaktors zur Ausdifferenzierung (Darr et al. 2006).

POU5F1 (POU class 5 homebox 1) oder auch als OCT-3/4 bekannt, kodiert für ein 360 Aminosäuren großen Transkriptionsfaktor. Die Mitglieder der POU-Familie

besitzen wie der NANOG-homebox-Transkriptionsfaktor ein hochkonserviertes Homöodomänen-Motiv. Das Allel liegt auf dem Chromosom 6p21.31.

OCT-3/4 reguliert ebenfalls die Pluripotenz in Zellen der Inneren-Zellmasse (Nichols et al. 1998). Niwa et al. (2000) beschrieben OCT-3/4 als „Master Regulator of pluripotency“, wobei die genauen Expressionslevel des Faktors bestimmen, ob die Zellen differenzieren, de-differenzieren oder die pluripotenten Eigenschaften erhalten bleiben (Niwa et al. 2000). Während der Differenzierung wird OCT-3/4 durch epigenetische Modifikation supprimiert. Dies bestätigt sich in Untersuchungen von De Jong et al. (2007), wo die Methylierung des OCT-3/4 Promotors in TGCT beschrieben wurde (De Jong et al. 2007). Die besondere Rolle von OCT-3/4 im Prozess der Selbsterneuerung von Stammzellen wird in „knock out“-Mäusen deutlich. Diese sterben früh in der Entwicklung, da ihnen die Fähigkeit zur Bildung der Inneren-Zellmasse fehlt. Demgegenüber wird eine Überexpression von OCT-3/4 im direkten Zusammenhang mit dem Entartungspotential von embryonalen Stammzellen in Verbindung gebracht (Abate-Shen 2003). Kehler et al. (2004) zeigten, dass ein „knock out“ von OCT-3/4 in TGCT Apoptose induzieren kann (Kehler et al. 2004).

Das SOX2 Gen kodiert für einen 317 Aminosäure großen Transkriptionsfaktor, der wie NANOG und OCT-3/4 essentiell für den Erhalt der pluripotenten Eigenschaften von embryonalen Stammzellen ist. Das Allel liegt auf dem Chromosom 3q26.3-q27. Das Genprodukt stabilisiert die Pluripotenz der Stammzellen indem es das Expressionslevel von OCT-3/4 kontrolliert (Masui et al. 2007). In neuronalen Stammzellen konnte die Aktivität von SOX2 ebenfalls nachgewiesen werden (Komitova und Eriksson 2004). Wobei die vermehrte Aktivität des Transkriptionsfaktors in Verbindung mit der Chemotherapieresistenz und den damit verknüpften Stammzeleigenschaften von Gliom-Zellen gebracht wurde (Jeon et al 2011). Interessanterweise scheint eine Überexpression von SOX2 in Plattenepithelkarzinomen der Lunge für eine bessere Prognose zu stehen (Wilbertz et al. 2011). Eine Mutation von SOX2 ist hingegen mit Anophthalmie und Anlagestörungen des Gehirns assoziiert (Hagstrom et al. 2005).

In embryonalen Stammzellen wirken die drei Transkriptionsfaktoren zusammen. Boyer et al. (2005) zeigten, dass eine große Anzahl von Genpromotoren von allen drei Faktoren gemeinsam besetzt werden und die drei Faktoren zusammen

Genexpression regulieren. Hierbei wird die Transkription in einer Gruppe von Genen aktiviert. Diese Gene sind besonders für den Erhalt der Pluripotenz wichtig. Genannt seien hier Gene der TGF- β - (z.B. TDGF1) und WNT-Signalkaskade. Des Weiteren regulieren die Faktoren ihre eigene und die Expression weiterer Transkriptionsfaktoren (Boyer et al. 2005; James et al. 2005; Sato et al. 2004). In einer zweiten Gruppe von Genen wurde die Transkription unterdrückt. Viele dieser Gene sind mit der Entwicklung und Differenzierung assoziiert. Da mit verminderter Expression von NANOG, OCT-3/4 und Sox2 vermehrt die differenzierungs-assoziierten-Gene exprimiert und die Gene der zuerst beschriebenen Gruppe vermindert exprimiert wurden, wurden die drei Transkriptionsfaktoren als Schlüsselregulatoren beim Erhalt der pluripotenten Kapazität definiert. Vermutet wird, dass die Aktivität der drei Transkriptionsfaktoren von anderen Co-Faktoren, ihrer genauen Konzentrationen und durch posttranslationale Modifikation reguliert wird. Wie genau die drei Faktoren einige Gene aktivieren und andere supprimieren können, war noch nicht klar. Somit untersuchten und postulierten Boyer et al. (2005) in der gleichen Studie, dass die drei Faktoren zusammen arbeiten, um verschiedene Vorwärtsverstärker- und autoregulatorische Schleifen zu bilden, und so, die Expression der unterschiedlichen Gene regulieren zu können (Boyer et al. 2005).

Es wurde vermutet, dass eine stöchiometrische Veränderung der Konzentrationsverhältnisse der drei Faktoren Störungen der normalen Genexpressionsregulation zur Folge haben und somit eine Entartung der Zelle begünstigen könnten (Boyer et al. 2005). Hierzu passt, dass in unterschiedlichen undifferenzierten Tumorentitäten eine Überexpression von Zielgenen der verschiedenen Pluripotenzmarker sowie die Suppression von Polycomb-Group-Protein-Zielgenen (verantwortlich unter anderem für Differenzierung) nachgewiesen werden konnten und dies den Verdacht verstärkt, dass in den Tumoren eine gestörte Aktivität der drei Faktoren eine Rolle spielt. In EC Zelllinien findet sich beispielsweise eine Überexpression von NANOG. Diese Beobachtungen lassen sich in vielen Tumoren auf epigenetische und transkriptionelle Dysregulation (siehe Einleitung) zurückführen (You et al. 2009). Somit ist von großem Interesse, gezielt die Stammzellsignatur in Tumoren zu verändern, wobei epigenetisch-wirkende Therapeutika vorhandene Dysregulationen beeinflussen könnten. Hieraus könnten sich neue Therapiemöglichkeiten ergeben. Zudem

gewähren diese Untersuchungen genauere Einblicke in Stammzellbiologie und möglichen Störungen und Regulationsmechanismen in undifferenzierten Tumoren.

You et al. (2009) untersuchten die Wirkung von Apicidin, einem anderen HDACi auf die NANOG-reiche EC-Zelllinie NCCIT. Apicidin supprimierte signifikant das Stammzellmuster in NCCIT Zellen. Hierbei wurde konkordant zu unseren Ergebnissen mit VPA, in NTERA-2 Zellen (ebenfalls NANOG reich) und der Seminom-Zelllinie TCam-2 am stärksten die Expression von NANOG beeinflusst. Die Untersuchungen von You et al. (2009) zeigten, dass NANOG-abhängig, OCT-3/4, SOX2 und weitere Stammzellgene vermindert exprimiert und Differenzierung induziert wurde. Die Suppression von NANOG konnte in NCCIT-Zellen das antiproliferative und antitumoröse Potential verbessern (You et al 2009). Die Ergebnisse legen nahe, dass auch VPA NANOG-abhängig nicht nur die Stammzellsignatur in beiden TGCT-Zelllinien beeinflussen kann, sondern genau auf diese Weise positiven Einfluss auf die Proliferation und Differenzierung nimmt. Apicidin regulierte NANOG über Transkriptionssinhibition, die durch negativ regulierende Veränderungen am NANOG -Promotor zustande kam. Unter anderem spielte hier die Methylierung des Promotors eine wichtige Rolle. Die genauen Mechanismen über die VPA neben der Histonhyperacetylierung die NANOG-Expression beeinflusst, waren nicht Gegenstand dieser Untersuchung.

Wie für embryonale Stammzellen erwähnt, stand auch in beiden TGCT-Zelllinien dem Verlust der Stammzellsignatur die vermehrte Expression von Differenzierungs-Markern gegenüber (**Abb16**).

EC-Zelllinien sind häufig genutzte Modelle. Sie lassen sich gezielt in verschiedene Gewebe differenzieren. TCam-2 ist eine neu etablierte Seminom-Zelllinie (Eckert et al. 2008; de Jong et al 2008).

Es ist bekannt, dass Seminome teilweise in Nicht-Seminome (EC, Dottersacktumore, Chorionkarzinome) differenzieren können (Oosterhuis und Looijenga 2005). Bisher war nicht klar, welche Mechanismen hierfür verantwortlich sind. Angenommen wurde, dass wie für die Pathogenese des ECs aus der ursprünglichen IGCNU/Seminom-Läsion vermutet, zunächst die Re-Aktivierung von pluripotenten Eigenschaften notwendig sei und anschließend, durch Differenzierung die unterschiedlichen histologischen Subtypen entstehen (de Jong et al. 2008). Nettersheim et al. (2011) zeigten, dass TGF- β 1, EGF und FGF4 gemeinsam

appliziert, in TCam-2-Zellen Differenzierung induzieren können. Hierbei entstanden Zellen, welche gemischten Nicht-Seminom-Zellen ähnelten. Die zytologischen Untersuchungen und die besondere Markerexpression zeigten, dass die Zellen vor allem extra-embryonalen Chorionkarzinom-Zellen ähnelten. Auf molekularer Ebene kam es unter Stimulation zur Suppression von Stammzell- und Expression von Differenzierungsmarkern. Dabei zeigten Nettersheim et al. (2011) über die SOX2/SOX17 Expression in den stimulierten Zellen, dass keine EC-Zwischenstufe vorhanden sein muss. So wurde, trotz der etwas verminderten Expression von SOX17 auf mRNA Ebene, unter Stimulation mit den Agenzien, die ganze Zeit SOX17 exprimiert. SOX2, als EC-determinierender Faktor, wurde unter der Differenzierungsinduktion hingegen nie exprimiert.

TGF- β 1, EGF und FGF4 bewirkten einen Block des BMP-, eine Aktivierung des Hippo- sowie eine Inhibition des LIN28/BLIMP1-Signalwegs. Die Aktivierung des Hippo-Signalwegs wurde über die Regulation von YAP1/TREAD4 gesteuert. Dies determinierte zum einen die trophektodermale Differenzierung, zum anderen hatte die Supprimierung von aktiven YAP1, welches ein potentiell Onkogen ist, gleichzeitig einen antiproliferativen Effekt (Nettersheim et al. 2011; Zhao et al 2008; Zhao et al. 2007). Sowohl über einen Block des BMP-Signalwegs (SMAD1), als auch über die Suppression von LIN28, wurde über Zwischenstufen BLIMP1 inhibiert und supprimiert. Diese Suppression löste wiederum den von Blimp1 vermittelten Differenzierungsblock (Nettersheim et al. 2011). Unsere Untersuchungen zeigten, dass VPA in TCam-2 Zellen Differenzierung induziert. Dabei wurden konkordant zu den Ergebnissen von Nettersheim et al. (2011) Stammzell-, Keimzell- und Seminommarker auf mRNA-Ebene supprimiert. Zudem fanden sich neben der Expression anderer Differenzierungsmarker, die vermehrte Expression trophektodermaler Marker (TEAD1, GATA6) (**Abb. 16 B**).

Es stellt sich die Frage, ob VPA anteilsweise die beschriebenen Signalwege beeinflusst. Und in der Tat werden auf mRNA Ebene einige der von Nettersheim beschriebenen Gene durch VPA in gleicher Weise verändert. SMAD1 und LIN 28 werden ebenso wie BLIMP1 supprimiert. YAP1 wird auch vermindert exprimiert. Die von Nettersheim et al. (2011) vorgeschlagenen Regulations-mechanismen lassen sich mit den von uns durchgeführten Untersuchungen nicht bis ins Detail bestätigen. Die Ergebnisse legen jedoch nahe, dass VPA in TCam-2 Zellen wenigstens zum Teil

die Differenzierung über ähnliche Mechanismen wie TGF- β 1, EGF und FGF4 induziert. Interessant ist hierbei die Tatsache, dass VPA sogar signifikant die Expression von FGF4 vermindert.

Diese Arbeit sollte sich mit der Wirkung von dem Histondeacetylase-Inhibitor Valproinsäure auf TGCT des Hodens befassen. VPA bestätigte seine antitumoröse Wirksamkeit in-vivo und in-vitro. VPA wirkte über verschiedene Wege antiproliferativ, sowie apoptose- und differenzierungs-induzierend in TGCT-Zelllinien.

Unsere Untersuchungen liefern einen globalen Überblick über die Effekte von VPA im Hinblick auf die Genexpression in TGCT. Hierdurch zeigen sich Interessante Ansätze die in Zukunft verfolgt werden sollten. Hier seien die Ko-Behandlung mit Standardchemotherapeutika bzgl. einer Dosisreduktion und die Beeinflussung von Platin-Resistenzen in TGCT zu nennen. Weiter bietet sich VPA als Differenzierungsagens in der Erforschung des Stammzellcharakters der TGCT an.

5 Zusammenfassung

Die malignen Keimzelltumoren des Hodens (TGCT) sind die häufigsten soliden malignen Tumoren des Mannes zwischen dem 15. und 34. Lebensjahr. Nach therapeutischen und histogenetischen Kriterien werden die TGCT in Seminome und Nicht-Seminome unterteilt.

Valproinsäure (VPA) gilt seit 2001 als weiterer Wirkstoff der Gruppe der Histondeacetylaseinhibitoren. Durch seine Wirkung auf die Chromatinstruktur werden durch die Behandlung mit VPA unterschiedliche Effekte in den Zellen erzielt. VPA führt in unterschiedlichen malignen Tumoren zu einer Inhibition der Proliferation und kann Apoptose und Differenzierung in Tumorzellen beeinflussen.

Unsere Untersuchungen beschäftigten sich mit der Wirkung von VPA auf TGCT. Im TGCT-Mausmodell sowie in TGCT-Zelllinien konnte die antitumoröse Wirkung von VPA bestätigt werden. Mittels Mikroarray-Expressionsanalyse wurde gezeigt, dass in TCam-2-Zellen (Modell für einen seminomatösen Tumor) 1810 und in NTERA-2-Zellen (Modell für ein Nicht-seminomatösen Tumor, genauer embryonales Karzinom) 1061 Gene unter VPA-Behandlung differentiell exprimiert wurden.

Der antiproliferative Effekt von VPA auf TGCT-Zelllinien wurde durch einen Proliferationsassay bestätigt. Unter den Genen der Expressionsanalyse fanden sich einige Kandidatengene, die diesen Effekt erklären könnten. Hierzu zählen die vermehrte Expression der Zellzyklus-regulierenden Gene Gadd 45 A und B und die Regulation verschiedener Wachstumsfaktoren. In der EC-Zelllinie NTERA-2 fand sich zudem die verminderte Expression des BCAT1-Gens.

Auch die Apoptose-induzierende Wirkung von VPA konnte in unserem Versuchsansatz gezeigt werden. Als relevantes Kandidatengen und Regulator sei der antiapoptotische-Faktor CFLAR genannt, der unter anderen mit Chemotherapie-resistenzen von einzelnen TGCT-Patienten in Verbindung gebracht wurde.

VPA unterdrückte in beiden Zelllinien das Stammzellgenmuster und induzierte Differenzierung. Besonders hervorzuheben ist die Suppression der Schlüsselgene zur Erhaltung der Pluripotenz NANOG, OCT-3/4 und SOX2 in NTERA-2-Zellen und die Suppression von NANOG und OCT-3/4 in TCam-2-Zellen.

Es lässt sich festhalten, dass VPA auch in TGCT eine gute antitumoröse-

Wirksamkeit zeigt. Besonders deutlich konnte der antiproliferative-Effekt dargestellt werden. In Zukunft könnten Co-Stimulationsuntersuchungen mit Standardchemotherapeutika im Hinblick auf eine Wirkungssteigerung, eine mögliche Dosisreduktion der Standardchemotherapie und Untersuchungen der Wirkung auf Resistenzen von Interesse sein. Weiter bietet sich VPA als differenzierungs-induzierendes Medikament in der Erforschung des Stammzellcharakters von TGCT an.

Literaturverzeichnis

- Abate-Shen C (2003): Homeobox genes and cancer: new OCTaves for an old tune. *Cancer Cell* 4: 329–30
- Albanell J, Bosl GJ, Reuter VE, Engelhardt M, Franco S, Moore MA, Dmitrovsky E (1999): Telomerase activity in germ cell cancers and mature teratomas. *J Natl Cancer Inst* 91: 1321-1326
- Albers P, Albrecht W, Algaba F, Bokemeyer C, Cohn-Cedermark G, Fizazi K, Horwich A, Laguna MP; European Association of Urology (2011): EAU guidelines on testicular cancer: 2011 update. *Eur Urol* 53: 478-96, 497-513
- Al-Hajj M, Wicha MS, Benito-Hernandez A, Morrison SJ, Clarke MF (2003): Prospective identification of tumorigenic breast cancer cells. *Proc Natl Acad Sci USA* 100: 3938-3988
- Almstrup K, Hoei-Hansen CE, Nielsen JE, Wirkner U, Ansorge W, Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Leffers H (2005): Genome-wide gene expression profiling of testicular carcinoma in situ progression into overt tumours. *Br J Cancer* 92: 1934-41
- Angelucci A, Valentini A, Millimaggi D, Gravina GL, Miano R, Dolo V, Vicentini C, Bologna M, Federici G, Bernardini S (2006): Valproic acid induces apoptosis in prostate carcinoma cell lines by activation of multiple death pathways. *Anticancer Drugs* 17: 1141-50
- Arce C, Perez-Plasencia C, Gonzalez-Fierro A, Cruz-Hernandez E, Revilla-Vazquez A, Chavez-Blanco A, Trejo-Becerril C, Perez-Cardenas E, Taja-Chayeb L, Bargallo E, Villarreal P, Ramirez T, Vela T, Candelaria M, Camargo MF, Robles E, Duenas-Gonzalez A (2006): A proof-of-principle study of epigenetic therapy added to neoadjuvant doxorubicin cyclophosphamide for locally advanced breast cancer. *PLoS One* 1: e98
- Bapat SA, Mali AM, Koppikar CB, Kurrey NK (2005): Stem and progenitor-like cells contribute to the aggressive behavior of human epithelial ovarian cancer. *Cancer Res* 65: 3025-3029
- Ben-Porath I, Thomson MW, Carey VJ, Ge R, Bell GW, Regev A, Weinberg RA. (2008): An embryonic stem cell-like gene expression signature in poorly differentiated aggressive human tumors. *Nat Genet* 40: 499-507
- Bergstrom R, Adami HO, Mohner M, Zatonski W, Storm H, Ekblom A, Tretli S, Teppo L, Akre O, Hakulinen T (1996): Increase in testicular cancer incidence in six European countries: a birth cohort phenomenon. *J Natl Cancer Inst* 88: 727-733
- Biermann K, Heukamp LC, Nettersheim D, Steger K, Zhou H, Franke FE, Guetgemann I, Sonnack V, Brehm R, Berg J, Bastian PJ, Müller SC, Wang-Eckert L, Schorle H, Büttner R (2007): Embryonal germ cells and germ cell tumors. *Verh Dtsch Ges Pathol* 91: 39-48
- Blander G, Guarente L. (2004): The Sir2 family of protein deacetylases. *Annu Rev Biochem* 73: 417-435.
- Boyer LA, Lee TI, Cole MF, Johnstone SE, Levine SS, Zucker JP, Guenther MG, Kumar RM, Murray HL, Jenner RG, Gifford DK, Melton DA, Jaenisch R, Young RA (2005): Core Transcriptional Regulatory Circuitry in Human Embryonic Stem Cells. *Cell* 122: 947–956
- Bremmer F, Thelen P, Pottek T, Behnes CL, Radzun HJ, Schweyer S (2012): Expression and function of the vitamin D receptor in malignant germ cell tumour of the testis. *Anticancer Res.* 32: 341-9
- Buetow SA. (1995): Epidemiology of testicular cancer. *Epidemiol Rev* 17, 433-49

- Bug G, Ritter M, Wassmann B, Schoch C, Heinzl T, Schwarz K, Romanski A, Kramer OH, Kampfmann M, Hoelzer D, Neubauer A, Ruthardt M, Ottmann OG (2005): Clinical trial of valproic acid and all-trans retinoic acid in patients with poor-risk acute myeloid leukemia. *Cancer* 104; 2717-2725
- Catalano MG, Fortunati N, Pugliese M, Poli R, Bosco O, Mastrocola R, Aragno M, Boccuzzi G (2006): Valproic acid, a histone deacetylase inhibitor, enhances sensitivity to doxorubicin in anaplastic thyroid cancer cells. *J Endocrinol* 191; 465-472
- Catalano MG, Pugliese M, Poli R, Bosco O, Bertieri R, Fortunati N, Boccuzzi G (2009): Effects of the histone deacetylase inhibitor valproic acid on the sensitivity of anaplastic thyroid cancer cell lines to imatinib. *Oncol Rep* 21; 515-521
- Cervoni N und Szyf M (2001): Demethylase activity is directed by histone acetylation. *J Biol Chem* 276; 40778–40787
- Cha HY, Lee BS, Kang S, Shin YS, Chang JW, Sung ES, Kim YS, Choi JW, Kim JH, Kim CH (2013): Valproic Acid Sensitizes TRAIL-Resistant Anaplastic Thyroid Carcinoma Cells to Apoptotic Cell Death. *Ann Surg Oncol*; doi10.1245/s10434-013-3232-y
- 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; 643-655
- Chateauvieux S, Morceau F, Dicato M, Diederich (2010): Molecular and Therapeutic Potential and Toxicity of valproic acid. *J Biomed Biotech* 2010; 1-18
- Chavez-Blanco A, Perez-Plasencia C, Perez-Cardenas E, Carrasco-Legleu C, Rangel-Lopez E, Segura-Pacheco B, Taja-Chayeb L, Trejo-Becerril C, Gonzalez-Fierro A, Candelaria M, Cabrera G, Duenas-Gonzalez A (2006): Antineoplastic effects of the DNA methylation inhibitor hydralazine and the histone deacetylase inhibitor valproic acid in cancer cell lines. *Cancer Cell Int* 6; 2
- 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; 533-542
- Cheng YC, Lin H, Huang MJ, Chow JM, Lin S, Liu HE (2007): Downregulation of c-Myc is critical for valproic acid-induced growth arrest and myeloid differentiation of acute myeloid leukemia. *Leuk Res* 31; 1403-1411
- Cinatl J Jr., Cinatl J, Scholz M, Driever PH, Henrich D, Kabickova H, Vogel JU, Doerr HW, Kornhuber B (1996): Antitumor activity of sodium valproate in cultures of human neuroblastoma cells. *Anticancer Drugs* 7; 766-773
- Cohen P, Peehl DM, Baker B, Liu F, Hintz RL, Rosenfeld RG.(1994): Insulin-like growth factor axis abnormalities in prostatic stromal cells from patients with benign prostatic hyperplasia. *J Clin Endocrinol Metab* 79; 1410-1415
- Darr H, Mayshar Y, Benvenisty N (2006): Overexpression of NANOG in human ES cells enables feeder-free growth while inducing primitive ectoderm features. *Development* 133; 1193-1201
- Das CM, Aguilera D, Vasquez H, Prasad P, Zhang M, Wolff JE, Gopalakrishnan V (2007): Valproic acid induces p21 and topoisomerase-II (alpha/beta) expression and synergistically enhances etoposide cytotoxicity in human glioblastoma cell lines. *J Neurooncol* 85; 159-170
- 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 OCT-3/4 for pre-invasive and invasive testicular germ cell tumours. *J Pathol* 206; 242-249
- de Jong J, Weeda S, Gillis AJ, Oosterhuis JW, Looijenga LH (2007): Differential methylation of the OCT-3/4 upstream region in primary human testicular germ cell tumors. *Oncol Rep* 18;127-32

- de Jong J, Stoop H, Gillis AJ, Hersmus R, van Gurp RJ, van de Geijn GJ, van Drunen E, Beverloo HB, Schneider DT, Sherlock JK, Baeten J, Kitazawa S, van Zoelen EJ, van Roozendaal K, Oosterhuis JW, Looijenga LH (2008): Further characterization of the first seminoma cell line TCam-2. *Genes Chrom Cancer* 47; 185-96
- Delcuve GP, Rastegar M, Davie JR (2009): Epigenetic control. *J Cell Physiol* 219; 243-50
- Del Vecchio MT, Epistolato MC, Tripodi SA, Montironi R, Giordano A (2006): Intratubular germ cell neoplasia of unclassified type. *Anal Quant Cytol Histol* 28, 157-70.
- de Roij DG und Mizrak SC (2008): Deriving multipotent stem cells from mouse spermatogonial stem cells: a new tool for developmental and clinical research. *Development* 135; 2207-2213
- Dick JE (2005): Acute myeloid leukemia stem cells. *Ann NY Acad Sci* 1044; 1-5
- Diekmann KP und Huland H: Hodentumore; in: *Urologie*. Hauptmann RE, Huland H; 2.Auflage; Springer-Verlag Berlin Heidelberg 2001; 223-237
- Duenas-Gonzalez A, Candelaria M, Perez-Plascencia C, Perez-Cardenas E, Cruz-Hernandez E, Herrera LA (2008): Valproic acid as epigenetic cancer drug: preclinical, clinical and transcriptional effects on solid tumors. *Cancer Treat Rev* 34; 206-222
- Dutton A, Young LS & Murray PG (2006): The role of cellular FLICE inhibitory protein (c-FLIP) in the pathogenesis and treatment of cancer. *Expert Opin Ther Targets* 10, 27–35.
- 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; 529-38
- Eisenhardt A, Sperling H, Jaeger T, Schatzl G, Rübber H, Steiner H: Hodentumoren; in: *Chirurgische Onkologie: Strategien und Standards für die Praxis*. Gnant M, Schlag PM; Auflage; Springer-Verlag Wien NewYork 2008; 399-408
- Friedmann I, Atmaca A, Chow KU, Jager E, Weidmann E (2006): Synergistic effects of valproic acid and mitomycin C in adenocarcinoma cell lines and fresh tumor cells of patients with colon cancer. *J Chemother* 18; 415-420
- Fuentes-Prior P and Salvesen GS (2004): The protein structures that shape caspase activity, specificity, activation and inhibition. *Biochem J* 384, 201–232
- Gallinari P, Di Marco S, Jones P, Pallaoro M, Steinkuhler C (2007): HDACs, histone deacetylation and gene transcription: from molecular biology to cancer therapeutics. *Cell Res* 17, 195-211.
- Geurts vK, Suijkerbuijk RF, Sinke RJ, Looijenga L, Oosterhuis JW, de Jong B (1993): Molecular cytogenetics of human germ cell tumours: i(12p) and related chromosomal anomalies. *Eur Urol* 23, 23-28
- Glozak MA, Sengupta N, Zhang X, Seto E. (2005): 1 Acetylation and deacetylation of non-histone proteins. *Gene* 363; 15-23
- Gondos B (1993): Ultrastructure of developing and malignant germ cells. *Eur Urol* 23; 68-74
- Göttlicher M, Minucci S, Zhu P, Kramer OH, Schimpf A, Giavara S, Sleeman JP, Lo CF, Nervi C, Pelicci PG, Heinzl T (2001): Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J* 20, 6969-78
- Hagstrom SA, Pauer GJ, Reid J, Simpson E, Crowe S, Maumenee IH, Traboulsi EI (2005): SOX2 mutation causes anophthalmia, hearing loss, and brain anomalies. *Am J Med Genet* 138; 95-8
- Henderson JK, Draper JS, Baillie HS, Fishel S, Thomson JA, Moore H, Andrews PW (2002): Preimplantation human embryos and embryonic stem cells show comparable expression of stage-specific embryonic antigens. *Stem Cells* 20;329–37
- Hodges-Gallagher L, Valentine CD, Bader SE, Kushner PJ (2007): Inhibition of histone deacetylase enhances the anti-proliferative action of antiestrogens on breast cancer cells and blocks tamoxifen-induced proliferation of uterine cells. *Breast Cancer Res Treat* 105; 297-309

- Honecker F, Stoop H, De Krijger RR, Chris Lau YF, Bokemeyer C, Looijenga LH (2004): Pathobiological implications of the expression of markers of testicular carcinoma in situ by fetal germ cells. *J Pathol* 203; 848-857
- Honecker F, Wermann H, Mayer F, Gillis AJ, Stoop H, van Gurp RJ, Oechsle K, Steyerberg E, Hartmann JT, Dinjens WN, Oosterhuis JW, Bokemeyer C, Looijenga LH (2009): Microsatellite instability, mismatch repair deficiency, and BRAF mutation in treatment-resistant germ cell tumors. *J Clin Oncol* 27; 2129-36.
- Horwich A, Shipley J, Huddart R (2006): Testicular germ-cell cancer. *Lancet* 367; 754-765
- Hubaux R, Vandermeers F, Crisanti MC, Kapoor V, Burny A, Mascaux C, Albelda SM, Willems L (2010): Preclinical evidence for a beneficial impact of valproate on the response of small cell lung cancer to first-line chemotherapy. *Eur J Cancer* 46; 1724-34
- Huss WJ, Gray DR, Werdin ES, Funkhouser WK Jr, Smith GJ (2004): Evidence of pluripotent human prostate stem cells in a human prostate primary xenograft model. *Prostate* 60; 77-90
- Hunt CR, Ramnarain D, Horikoshi N, Iyengar P, Pandita RK, Shay JW, Pandita TK (2013): Histone Modifications and DNA Double-Strand Break Repair after Exposure to Ionizing Radiations. *Radiation Research* 179; 383-392
- Iacomino G, Medici MC, Russo GL. (2008): Valproic acid sensitizes K562 erythroleukemia cells to TRAIL/Apo2L-induced apoptosis. *Anticancer Res* 28; 855-64
- Inoue Y, Suzuki T, Takimoto M, Irei M, Yoshioka S, Shibuya Y, Kato M, Koike M, Takahashi M (2005): Treatment with valproic acid for myelofibrosis with myeloid metaplasia. *Ann Hematol* 84; 833-834
- Jack RH, Davies EA, Moller H (2007): Testis and prostate cancer incidence in ethnic groups in South East England. *Int J Androl* 30; 215-220
- James D, Levine AJ, Besser D, Hemmati-Brivanlou A (2005): TGFbeta/activin/nodal signaling is necessary for the maintenance of pluripotency in human embryonic stem cells. *Development* 131; 1273-82
- Jason LJ, Moore SC, Lewis JD, Lindsey G, Ausio J (2002): Histone ubiquitination: a tagging tail unfolds? *Bioessays* 24; 166-174
- Jenuwein T, Allis CD (2001): Translating the histone code. *Science* 293; 1074-1080
- Jeon HM, Sohn YW, Oh SY, Kim SH, Beck S, Kim S, Kim H (2011): ID4 imparts chemoresistance and cancer stemness to glioma cells by derepressing miR-9*-mediated suppression of SOX2. *Cancer Res* 71; 3410-21
- Jin S, Antinore MJ, Lung FD, Dong X, Zhao H, Fan F, Colchagie AB, Blanck P, Roller PP, Fornace AJ Jr, Zhan Q (2000): The GADD45 inhibition of Cdc2 kinase correlates with GADD45-mediated growth suppression. *J Biol Chem* 275; 16602-8
- Kehler J, Tolkunova E, Koschorz B, Pesce M, Gentile L, Lomeli H, Nagy A, McLaughlin KJ, Scholer HR, Boiani M, Tomilin A (2004): Oct4 is required for primordial germ cell survival. *EMBO reports* 5; 1078-1083
- Kelly WK, O'Connor OA, Krug LM, Chiao JH, Heaney M, Curley T, MacGregore-Cortelli B, Tong W, Secrist JP, Schwartz L, Richardson S, Chu E, Olgac S, Marks PA, Scher H, Richon VM (2005): Phase I study of an oral histone deacetylase inhibitor, suberoylanilide hydroxamic acid, in patients with advanced cancer. *J Clin Oncol* 23; 3923-31
- Kersemaekers AM, Mayer F, Molier M, van Weeren PC, Oosterhuis JW, Bokemeyer C, Looijenga LH (2002): Role of P53 and MDM2 in treatment response of human germ cell tumors. *J Clin Oncol* 20; 1551-1561

- Kim CF, Jackson EL, Woolfenden AE, Lawrence S, Babar I, Vogel S, Crowley, Bronson RT, Jacks T (2005): Identification of bronchioalveolar stem cells in normal lung and lung cancer. *Cell* 121; 823-835
- Kim SS, Cho HJ, Cho JM, Kang JY, Yang HW, Yoo TK (2013): Dual silencing of Hsp27 and c-FLIP enhances doxazosin-induced apoptosis in PC-3 prostate cancer cells. *ScientificWorldJournal*; doi: 10.1155/2013/174392
- Komitova M, Eriksson PS (2004): Sox-2 is expressed by neural progenitors and astroglia in the adult rat brain. *Neurosci Lett* 369; 24-7
- Korkola JE, Houldsworth J, Chadalavada RS, Olshen AB, Dobrzynski D, Reuter VE, Bosl GJ, Chaganti RS (2006): Down-regulation of stem cell genes, including those in a 200-kb gene cluster at 12p13.31, is associated with in vivo differentiation of human male germ cell tumors. *Cancer Res* 66; 820-7
- Korkola JE, Houldsworth J, Feldman DR, Olshen AB, Qin LX, Patil S, Reuter VE, Bosl GJ, Chaganti RS (2009): Identification and validation of a gene expression signature that predicts outcome in adult men with germ cell tumors. *J Clin Oncol* 27; 5240-7
- Lachner M, Jenuwein T (2002): The many faces of histone lysine methylation. *Curr Opin Cell Biol* 14:286-298.
- Lagneaux L, Gillet N, Stamatopoulos B, Delforge A, Dejeneffe M, Massy M, Meuleman N, Kentos A, Martiat P, Willems L, Bron D (2007): Valproic acid induces apoptosis in chronic lymphocytic leukemia cells through activation of the death receptor pathway and potentiates TRAIL response. *Exp Hematol* 35; 1527-37
- Landgrebe J, Bretz F und Brunner E (2006): Efficient design and analysis of two colour factorial microarray experiments. *Comp Stat & Data Analysis* 50; 499-517
- Lee TI, Young RA (2000): Transcription of eukaryotic protein-coding genes. *Annu Rev Genet* 34, 77-137
- Li C, Heidt DG, Dalerba P, Burant CF, Zhang L, Adsay V, Wicha M, Clarke MF, Simeone DM (2007): Identification of pancreatic cancer stem cells. *Cancer Res* 67; 1030-1037
- Li J, Bonifati S, Hristov G, Marttila T, Valmary-Degano S, Stanzel S, Schnölzer M, Mouglin C, Aprahamian M, Grekova SP, Raykov Z, Rommelaere J, Marchini A (2013): Synergistic combination of valproic acid and oncolytic parvovirus H-1PV as a potential therapy against cervical and pancreatic carcinomas. *EMBO Mol Med* 5; 1537-55
- 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, 1912-1922
- Lind GE, Skotheim RI, Lothe RA (2007): The epigenome of testicular germ cell tumors. *APMIS* 115; 1147-1160
- Liu N, Lu M, Tian X, Han Z (2007): Molecular Mechanisms Involved in Self-Renewal and Pluripotency of Embryonic Stem Cells. *J Cell Physiol* 211; 279-283
- Livak KJ, Schmittgen TD (2001): Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2^{(-Delta Delta C (T))} Method. *Methods* 25; 402-408
- Longley DB, Wilson TR, McEwan M, Allen WL, McDermott U, Galligan L & Johnston PG. (2006): c-FLIP inhibits chemotherapy-induced colorectal cancer cell death. *Oncogene* 25, 838-848
- Longworth MS, Laimins LA (2006): Histone deacetylase 3 localizes to the plasma membrane and is a substrate of Src. *Oncogene* 25;4495-4500

- Looijenga LH (2008): Human testicular(non)seminomatous germ cell tumors: Patho-biology and optimal diagnostics. *J Pathol* 191; 187-192
- Looijenga LH (2009): Advances in basic research on testicular germ cell tumors. Clinical implications. *Urologe A* 48, 350-8
- Looijenga LH, Verkerk AJ, Dekker MC, van Gurp RJ, Gillis AJ, Oosterhuis JW (1998): Genomic imprinting in testicular germ cell tumours. *APMIS* 106; 187-195
- Looijenga LH, Gillis AJ, Stoop HJ, Hersmus R, Oosterhuis JW (2007): Chromosomes and expression in human testicular germ-cell tumors: insight into their cell of origin and pathogenesis. *Ann NY Acad Sci* 1120; 187-214
- Looijenga LH, Gillis AJM, Stoop HJ, Biermann K, Oosterhuis JW (2011): Dissecting the molecular pathways of (testicular) germ cell tumour pathogenesis; from initiation to treatmentresistance. *Int J Androl* 34, e234–e251
- Loy V, Dieckmann KP (1990): Carcinoma in situ of the testis: intratubular germ cell neoplasia or testicular intraepithelial neoplasia? *Hum Pathol* 21; 557-558
- Luo A, Wang W, Sima N, Lu Y, Zhou J, Xu G, Yu H, Wang S, Ma D (2008): Short hairpin RNA targeting c-FLIP sensitizes human cervical adenocarcinoma Hela cells to chemotherapy and radiotherapy. *Cancer Lett* 271, 323–332
- Marchion DC, Bicaku E, Daud AI, Sullivan DM, Munster PN (2005): Valproic acid alters chromatin structure by regulation of chromatin modulation proteins. *Cancer Res* 65; 3815–3822, 2005
- Marks PA, Miller T, Richon VM (2003): Histone Deacetylases. *Curr Opin Pharmacol* 3;344-351
- Marks PA, Richon VM, Rifkind RA (2000): Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells. *J Nat Cancer Instit* 92;1210–1216
- Masters JR, Koberle B (2003): Curing metastatic cancer: lessons from testicular germ-cell tumours. *Nat Rev Cancer* 3; 517-525
- Masui S, Nakatake Y, Toyooka Y, Shimosato D, Yagi R, Takahashi K, Okochi H, Okuda A, Matoba R, Sharov AA, Ko MS, Niwa H (2007): Pluripotency governed by Sox2 via regulation of Oct-3/4 expression in mouse embryonic stem cells. *Nat Cell Biol* 9; 625-35
- Mayer F, Gillis AJM, Dinjens W, Oosterhuis JW, Bokemeyer C, Looijenga LHJ. (2002): Microsatellite instability of germ cell tumors is associated with resistance to systemic treatment. *Cancer Res* 62, 2758–2760
- McGlynn KA, Devesa SS, Graubard BI, Castle PE (2005): Increasing incidence of testicular germ cell tumors among black men in the United States. *J Clin Oncol* 23; 5757-5761
- McGlynn KA, Devesa SS, Sigurdson AJ, Brown LM, Tsao L., Tarone RE (2003): Trends in the incidence of testicular germ cell tumors in the United States. *Cancer* 97; 63-70
- Melnick A, Licht JD (2002): Histone deacetylases as therapeutic targets in hematologic malignancies. *Curr Opin Hemat* 9; 322–332
- Mikuz G: Männliche Geschlechtsorgane; in: Pathologie. Böcker W; Denk H; Heitz U; Moch H; 4.Auflage; Elsevier GmbH; München, Jena 2008; 900-908
- Mongan NP, Gudas LJ (2005): Valproic acid, in combination with all-trans retinoic acid and 5-aza-2'-deoxycytidine, restores expression of silenced RARbeta2 in breast cancer cells. *Mol Cancer Ther* 4; 477-486
- Mueller T, Mueller LP, Luetzkendorf J, Voigt W, Simon H, Schmoll HJ (2006): Loss of Oct-3/4 Expression in Embryonal Carcinoma Cells Is Associated with Induction of Cisplatin Resistance. *Tumor Biol* 27, 71–83

- Na YK, Lee SM, Hong HS, Kim JB, Park JY, Kim DS (2010): Hypermethylation of growth arrest DNA-damage-inducible gene 45 in non-small cell lung cancer and its relationship with clinicopathologic features. *Mol Cells* 30; 89-92
- Nathan D, Sterner DE, Berger SL (2003): Histone modifications: Now summoning sumoylation. *Proc Natl Acad Sci USA* 100; 13118-13120.
- Nettersheim D, Gillis AJ, Looijenga LH, Schorle H (2011): TGF- β 1, EGF and FGF4 synergistically induce differentiation of the seminoma cell line TCam-2 into a cell type resembling mixed non-seminoma. *Int J Androl* 34;189-203
- Netto GJ, Nakai Y, Nakayama M, Jadallah S, Toubaji A, Nonomura N, Albadine R, Hicks JL, Epstein JI, Yegnasubramanian S, Nelson WG, De Marzo AM (2008): Global DNA hypomethylation in intratubular germ cell neoplasia and seminoma, but not in nonseminomatous male germ cell tumors. *Mod Pathol* 21; 1337-1344
- Nichols J, Zevnik B, Anastassiadis K, Niwa H, Klewe-Nebenius D, Chambers I, Schöler H, Smith A (1998): Formation of pluripotent stem cells in the mammalian embryo depends on the POU transcription factor Oct4. *Cell* 95; 379–91
- 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; 372-376
- Nowak SJ, Corces VG (2004): Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *Trends Genet* 20; 214-220
- Olsen CM, Meussen-Eiholm ET, Roste LS, Tauboll E (2004): Antiepileptic drugs inhibit cell growth in the human breast cancer cell line MCF7. *Mol Cell Endocrinol* 213; 173-179
- Olsen E, Kim YH, Kuzel T (2006): Vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) is clinically active in advanced cutaneous T-cell lymphoma (CTCL): results of a phase IIb trial. *J Clin Oncol*; 2006 ASCO Annual Meeting Proceedings Part I 24(18S): abstr 7500
- Oosterhuis J und Looijenga LH (2005): Testicular germ-cell tumours in a broader perspective. *Nat Rev Cancer* 5; 210-222
- Passegue E, Jamieson CH, Ailles LE, Weissman IL (2003): Normal and leukemic hematopoiesis: are leukemias a stem cell disorder or a reacquisition of stem cell characteristics? *Proc Natl Acad Sci* 100; 11842–11849
- Pathil A, Armeanu S, Venturelli S, Mascagni P, Weiss TS, Gregor M, Lauer UM, Bitzer M(2006): HDAC inhibitor treatment of hepatoma cells induces both TRAIL-independent apoptosis and restoration of sensitivity to TRAIL. *Hepatology* 43; 425-434
- Polyak K, Hahn WC (2006): Roots and stems: stem cells in cancer. *Nat Med* 12; 296-300
- Ponti D, Costa A, Zaffaroni N, Pratesi G, Petrangolini G, Coradini D, Pilotti S, Pierotti MA, Daidone MG (2005): Isolation and in vitro propagation of tumorigenic breast cancer cells with stem/progenitor cell properties. *Cancer Res* 65; 5506-5511
- Rajpert-De Meyts E (2006): Developmental model for the pathogenesis of testicular carcinoma in situ: genetic and environmental aspects. *Hum Reprod Update* 12; 303-323
- Richon VM, Webb Y, Merger R, Sheppard T, Jursic B, Ngo L, Civoli F, Breslow R, Rifkind RA, Marks PA (1996): Second generation hybrid polar compounds are potent inducers of transformed cell differentiation. *Proc Natl Acad Sci USA* 93; 5705-8.

RKI und GEKID:

- Krebs in Deutschland 2003 – 2004. Häufigkeiten und Trends. 6. überarbeitete Auflage. Robert Koch-Institut (Hrsg) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. (Hrsg). Berlin, 2008
- Rocca A, Minucci S, Tosti G, Croci D, Contegno F, Ballarini M, Nole F, Munzone E, Salmaggi A, Goldhirsch A, Pelicci PG, Testori A (2009): A phase I-II study of the histone deacetylase inhibitor valproic acid plus chemoimmunotherapy in patients with advanced melanoma. *Br J Cancer* 100: 28-36
- Roth SY, Denu JM, Allis DC (2001): Histone acetyltransferases. *Annu Rev Biochem* 70: 81-120
- Sato N, Meijer L, Skaltsounis L, Greengard P, Brivanlou AH.(2004): Maintenance of pluripotency in human and mouse embryonic stem cells through activation of Wnt signaling by a pharmacological GSK-3-specific inhibitor. *Nat Med* 10: 55-63
- Schuchmann M, Schulze-Bergkamen H, Fleischer B, Schattenberg JM, Siebler J, Weinmann A, Teufel A, Wörns M, Fischer T, Strand S, Lohse AW, Galle PR (2006): Histone deacetylase inhibition by valproic acid down-regulates c-FLIP/CASH and sensitizes hepatoma cells towards CD95- and TRAIL receptor-mediated apoptosis and chemotherapy. *Oncol Rep* 15: 227-30
- Shackleton M, Vaillant F, Simpson KJ, Stingl J, Smyth GK, Asselin-Labat ML, Wu L, Lindeman GJ, Visvader JE (2006): Generation of a functional mammary gland from a single stem cell. *Nature* 439: 84-88
- Shah MN, Devesa SS, Zhu K, McGlynn KA (2007): Trends in testicular germ cell tumours by ethnic group in the United States. *Int J Androl* 30: 206-213
- Shirsath N, Rathos M, Chaudhari U, Sivaramakrishnan H, Joshi K (2013): Potentiation of anticancer effect of valproic acid, an antiepileptic agent with histone deacetylase inhibitory activity, by the cyclin-dependent kinase inhibitor P276-00 in human non-small-cell lung cancer cell lines. *Lung Cancer pii: S0169-5002(13)00365-6*
- Singh SK, Clarke ID, Terasaki M, Bonn VE, Hawkins C, Squire J, Dirks PB (2003): Identification of a cancer stem cell in human brain tumors. *Cancer Res* 63: 5821-5828
- Skakkebaek NE (2003): Testicular dysgenesis syndrome. *Horm Res* 60, 49
- Skakkebaek NE, Berthelsen JG, Giwercman A, Muller J (1987): Carcinoma-in-situ of the testis: possible origin from gonocytes and precursor of all types of germ cell tumours except spermatocytoma. *Int J Androl* 10, 19–28
- Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E; Main KM (2001): Testicular dysgenesis syndrome: an increasingly common developmental disorder with environmental aspects. *Hum Reprod* 16, 972–978
- Skotheim RI, Lind GE, Monni O, Nesland JM, Abeler VM, Fosså 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, 5588-98
- Smalley M und Ashworth A (2003): Stem cells and breast cancer: a field in transit. *Nat Rev Cancer* 3, 832–844
- Sonne SB, Kristensen DM, Novotny GW, Olesen IA, Nielsen JE, Skakkebaek NE, Rajpert-De Meyts E, Leffers H (2008): Testicular dysgenesis syndrome and the origin of carcinoma in situ testis. *Int J Androl* 31, 275–287

- Soriano AO, Yang H, Faderl S, Estrov Z, Giles F, Ravandi F, Cortes J, Wierda WG, Ouzounian S, Quezada A, Pierce S, Estey EH, Issa JP, Kantarjian HM, Garcia-Manero G (2007): Safety and clinical activity of the combination of 5-azacytidine, valproic acid, and all-trans retinoic acid in acute myeloid leukemia and myelodysplastic syndrome. *Blood* 110; 2302-2308
- Sperger JM, Chen X, Draper JS, Antosiewicz JE, Chon CH, Jones SB, Brooks JD, Andrews PW, Brown PO, Thomson JA (2003): Gene expression patterns in human embryonic stem cells and human pluripotent germ cell tumors. *Proc Natl Acad Sci USA* 100; 13350-5
- Spierings DC, de Vries EG, Vellenga E & de Jong S (2003): Loss of drug-induced activation of the CD95 apoptotic pathway in a cisplatin-resistant testicular germ cell tumor cell line. *Cell Death Differ* 10, 808–822
- Su JM, Li XN, Thompson P, Ou CN, Ingle AM, Russell H, Lau CC, Adamson PC, Blaney SM (2011): Phase 1 study of valproic acid in pediatric patients with refractory solid or CNS tumors: a children's oncology group report. *Clin Cancer Res* 17; 589-97
- Tesei A, Briigliadori G, Carloni S, Fabbri F, Ulivi P, Arienti C, Sparatore A, Del Soldato P, Pasini A, Amadori D, Silvestrini R, Zoli W (2012): Organosulfur derivatives of the HDAC inhibitor valproic acid sensitize human lung cancer cell lines to apoptosis and to cisplatin cytotoxicity. *J Cell Physiol* 227; 3389-96
- Thelen P, Schweyer S, Hemmerlein B, Wuttke W, Seseke F, Ringert RH (2004): Expressional changes after histone deacetylase inhibition by valproic acid in LNCaP human prostate cancer cells. *Int J Oncol.* 24;25-31
- Tittle TV und Schaumann BA (1992): Effect of antiepileptic drugs on growth of murine lymphoid tumor cells in single-cell culture. *Epilepsia* 33; 729-735
- Tront JS, Hoffman B, Liebermann DA (2006): Gadd45a suppresses Ras-driven mammary tumorigenesis by activation of c-Jun NH2-terminal kinase and p38 stress signaling resulting in apoptosis and senescence. *Cancer Res* 66, 8448-8454
- Trounson A (2004): Stem cells, plasticity and cancer - uncomfortable bed fellows. *Devel* 131; 2763-2768
- van Gurp RJ, Oosterhuis JW, Kalscheuer V, Mariman EC, Looijenga LH (1994): Biallelic expression of the H19 and IGF2 genes in human testicular germ cell tumors. *J Natl Cancer Inst* 86; 1070-1075
- Velasco A, Riquelme E, Schultz M, Wistuba II, Villarroel L, Koh MS, Leach FS (2004a): Microsatellite instability and loss of heterozygosity have distinct prognostic value for testicular germ cell tumor recurrence. *Cancer Biol Ther* 3, 1152-58
- Velasco A, Riquelme E, Schultz M, Wistuba II, Villarroel L, Pizarro J, Berlin A, Ittmann M, Koh MS, Leach FS (2004b): Mismatch repair gene expression and genetic instability in testicular germ cell tumor. *Cancer Biol Ther* 3, 977–982
- Venturelli S, Armeanu S, Pathil A, Hsieh CJ, Weiss TS, Vonthein R, Wehrmann M, Gregor M, Lauer UM, Bitzer M (2007): Epigenetic combination therapy as a tumor-selective treatment approach for hepatocellular carcinoma. *Cancer* 109; 2132-2141
- Venkataramani V, Thiele K, Behnes CL, Wulf GG, Thelen P, Opitz L, Salinas-Riester G, Wirths O, Bayer TA, Schweyer S (2012): Amyloid precursor protein is a biomarker for transformed human pluripotent stem cells. *Am J Pathol* 180; 1636-52
- Vigushin DM und Coombes RC (2002): Histone deacetylase inhibitors in cancer treatment. *Anti-Cancer Drugs* 13; 1–13
- Walsh TJ, Davies BJ, Croughan MS, Carroll PR, Turek PJ (2008): Racial differences among boys with testicular germ cell tumors in the United States. *J Urol* 179; 1961-1965
- Weinstein IB (2002): Cancer. Addiction to oncogenes--the Achilles heel of cancer. *Science* 297; 63-64

- Wilbertz T, Wagner P, Petersen K, Stiedl AC, Scheble VJ, Maier S, Reischl M, Mikut R, Altorki NK, Moch H, Fend F, Staebler A, Bass AJ, Meyerson M, Rubin MA, Soltermann A, Lengerke C, Perner S (2011): SOX2 gene amplification and protein overexpression are associated with better outcome in squamous cell lung cancer. *Mod Pathol* 24; 944-953
- Yang JK (2008): FLIP as an anti-cancer therapeutic target. *Yonsei Med J* 49; 19–27
- Yang YH, Dudoit S, Luu P, Lin DM, Peng V, Ngai J, Speed TP (2002): Normalization for cDNA microarray data: a robust composite method addressing single and multiple slide systematic variation. *Nucleic Acids Res* 30; e15
- 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; 5716-5725
- Zhao B, Wei X, Li W, Udan RS, Yang Q, Kim J, Xie J, Ikenoue T, Yu J, Li L, Zheng P, Ye K, Chinnaiyan A, Halder G, Lai ZC, Guan KL (2007): Inactivation of YAP oncoprotein by the Hippo pathway is involved in cell contact inhibition and tissue growth control. *Genes Dev* 21; 2747-61
- Zhao B, Lei QY, Guan KL (2008): The Hippo-YAP pathway: new connections between regulation of organ size and cancer. *Curr Opin Cell Biol* 20; 638-46
- Zhou W, Feng X, Li H, Wang L, Li H, Zhu B, Zhang H, Yao K, Ren C (2007): Functional evidence for nasopharyngeal carcinoma-related gene BCAT1 located at 12p12. *Oncol Res* 16; 405-13
- Zhou W, Feng X, Ren C, Jiang X, Liu W, Huang W, Liu Z, Li Z, Zeng L, Wang L, Zhu B, Shi J, Liu J, Zhang C, Liu Y, Yao K(2013): Over-expression of BCAT1, a c-Myc target gene, induces cell proliferation, migration and invasion in nasopharyngeal carcinoma. *Mol Cancer* 8; doi: 10.1186/1476-4598-12-53
- Zhu WG, Otterson GA (2003): The interaction of histone deacetylase inhibitors and DNA methyltransferase inhibitors in the treatment of human cancer cells. *Curr Med Anticancer Agents* 3, 187-199
- Ziauddin MF, Yeow WS, Maxhimer JB, Baras A, Chua A, Reddy RM, Tsai W, Cole GW Jr, Schrumpp DS, Nguyen DM (2006): Valproic acid, an antiepileptic drug with histone deacetylase inhibitory activity, potentiates the cytotoxic effect of Apo2L/TRAIL on cultured thoracic cancer cells through mitochondria-dependent caspase activation. *Neoplasia* 8; 446-457.

Danksagung

Danken möchte ich Prof. Dr. med. H.-J. Radzun für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und aller zur Anwendung gekommenen Geräte und Materialien.

Mein besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. med. S. Schweyer für die Überlassung des Themas und seine immer vorhandene Unterstützung.

Des Weiteren möchte ich allen Mitarbeitern der Abteilung Allgemeine Pathologie, insbesondere Frau Anke Klages, danken, die mich über den gesamten Zeitraum meiner Tätigkeit im Labor mit vielerlei molekularbiologischen Arbeitsmethoden vertraut gemacht haben und mir immer mit viel Geduld und zahlreichen Hilfestellungen zur Seite standen. Mein weiterer Dank gilt dem Team des Transkriptomanalyselabor.

Des Weiteren danke ich meiner Familie für die hilfreichen Korrekturen und Hilfe.

Lebenslauf:

Im Jahre 1983 wurde ich als zweiter Sohn von Uwe Thiele und Ehefrau Undine, geb. Käufer, in Heide geboren. Mein Vater ist Oberstudienrat am Werner-Heisenberg-Gymnasium Heide. Meine Mutter war Lehrerin an einer Realschule. Mein älterer Bruder Lars arbeitet als examinierter Krankenpfleger.

Im August 1990 wurde ich in die Grundschule Ostrohe eingeschult. Nach vier Jahren wechselte ich auf das Gymnasium Heide-Ost. Im Juni 2003 erlangte ich dort meine Hochschulreife.

Von August 2003 bis zum Mai 2004 absolvierte ich meinen Zivildienst auf der operativen Intensiveinheit des Westküstenklinikums Heide.

Im Anschluss an meinen Zivildienst im August 2004 schloss ich eine dreimonatige Ausbildung zum Rettungssanitäter erfolgreich ab.

Zum Wintersemester 2004 konnte ich mein Studium an der Medizinischen Fakultät der Georg-August-Universität Göttingen beginnen. Am 22.09.2006 bestand ich das Physikum mit der Note -Sehr gut-. Am 18.05.2011 bestand ich die Ärztliche Prüfung mit der Note -Gut- und erhielt am 07.06.2011 meine Approbation als Arzt. Während des Studiums arbeitete ich als studentischer Assistent der Anatomie und übte die Tätigkeit als Pflegehelfer im Krankenhaus Lengler aus.

Seit dem 01.10.2011 arbeite ich als Assistenzarzt der Inneren Medizin im Klinikum Bremerhaven.

Im April 2008 begann ich im Labor der Abteilung Pathologie unter der Leitung von Herrn Prof. Dr. H.-J. Radzun und PD Dr. S. Schweyer die experimentellen Arbeiten zu der hier vorliegenden Dissertation.