

Aus dem Institut und der Poliklinik für Arbeits- und Umweltmedizin

Ludwig-Maximilians-Universität München

Direktor: Prof. Dr. med. Dennis Nowak

**Effekte von Cisplatin, Natriumbutyrat und
Sirtinol auf kovalente Histonmodifikationen
in menschlichen Zellen**

DISSERTATION

zum Erwerb des Doktorgrades der Zahnmedizin

an der Medizinischen Fakultät der

Ludwig-Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von

Mechthild Kastner

aus

Zürich

2010

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Prof. Dr. Dennis Nowak

Mitberichterstatter: Priv. Doz. Dr. Dorit Nögler
Prof. Dr. Jörg Tatzelt

Mitbetreuung durch den
promovierten Mitarbeiter: PD Dr. rer. nat. Rudolf A. Jörres

Dekan: Prof. Dr. med. Dr. h.c. M. Reiser, FACR, FRCR

Tag der mündlichen Prüfung: 23.03.2010

für Georg

I. Inhaltsverzeichnis

I.	Inhaltsverzeichnis	1
II.	Abkürzungsverzeichnis	4
1.	Einleitung	7
2.	Hintergrund der Untersuchung	8
	2.1. Charakteristika des Bronchialkarzinoms.....	8
	2.2. Therapie des Bronchialkarzinoms.....	9
	2.3. Wirkung von Cisplatin.....	13
	2.4. Zellbiologie von Tumorzellen.....	16
	2.4.1. Faktoren unlimitierter Proliferation.....	16
	2.4.2. Onkogene und Tumorsuppressorgene.....	17
	2.5. Epigenetik von Tumorzellen.....	20
	2.5.1. DNA-Methylierung.....	21
	2.5.2. Chromatinstruktur.....	22
	2.5.3. Histonmodifikationen.....	24
	2.5.3.1. Histonacetylierung.....	24
	2.5.3.2. Histonmethylierung.....	25
	2.5.3.3. Histonphosphorylierung.....	26
	2.5.4. Histonmodifizierende Enzyme.....	26
	2.5.4.1. Histon-Acetyltransferasen und Histon- Deacetylasen.....	26
	2.5.4.2. Histon-Methyltransferasen.....	27
	2.6. Epigenetische therapeutische Ansätze.....	28
	2.6.1. DNA-Methyltransferase-Inhibitoren.....	28
	2.6.2. Histon-Deacetylase-Inhibitoren.....	28
3.	Ziel der Arbeit	30

4.	Material und Methoden	31
4.1.	Verwendete Zelllinien.....	31
4.2.	Zellkultur und Expositionsschema.....	32
4.2.1.	Kultivierung der Zelllinien.....	32
4.2.2.	Passagierung der Zellen.....	32
4.2.3.	Exposition der Zellen.....	33
4.2.4.	Expositionsschema.....	34
4.2.5.	Abernten der exponierten Zellen.....	35
4.3.	Aufarbeitung der Proben.....	36
4.3.1.	Histonextraktion aus gefrorenen Zellpellets.....	36
4.3.2.	TCA-Fällung von Proteinen.....	37
4.4.	Gelelektrophorese.....	38
4.4.1.	Vorbereitung der Proben für die Gelelektrophorese.....	38
4.4.2.	Durchführung der Gelelektrophorese.....	39
4.5.	Analyse der Histonmodifikationen mittels Western Blot.....	41
4.5.1.	Durchführung des Western Blot.....	41
4.5.2.	Coomassie-Färbung eines Proteingels.....	43
4.5.3.	Detektion eines Western Blots.....	43
4.5.4.	Filmentwicklung.....	46
4.5.5.	Amidoschwarz-Färbung einer Membran.....	46
4.5.6.	Stripping und Reprobing.....	47
4.6.	Auswertung und statistische Analyse.....	50
4.6.1.	Auswertung der Röntgenbilder.....	50
4.6.2.	Statistische Analyse.....	51
5.	Ergebnisse	53
5.1.	Ergebnisse der Western Blots.....	53
5.1.1.	EPLC-Zellen, Kontrolle und Cisplatin (n=14).....	54
5.1.2.	EPLC-Zellen, Cisplatin und Natriumbutyrat.....	58
5.1.3.	EPLC-Zellen, Cisplatin und Sirtinol.....	62
5.1.4.	Beas-2B-Zellen, Cisplatin und Natriumbutyrat.....	66

5.1.5. HCC-Zellen, Cisplatin und Natriumbutyrat.....	70
5.2. Zellzahl und Kulturverlauf.....	74
5.2.1. EPLC-Zellen, Kontrolle und Cisplatin (n=14).....	74
5.2.2. EPLC-Zellen, Cisplatin und Natriumbutyrat.....	75
5.2.3. EPLC-Zellen, Cisplatin und Sirtinol.....	76
5.2.4. Beas-2B-Zellen, Cisplatin und Natriumbutyrat.....	76
5.2.5. HCC-Zellen, Cisplatin und Natriumbutyrat.....	77
5.3. Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der Histonmodifikationen.....	80
6. Diskussion.....	82
6.1. Wirkungen auf die Zellzahl.....	83
6.2. Die Zellzahl in Beziehung zu Histonmarkern für Apoptose und Mitose.....	85
6.3. Wirkungen auf die Histon-Acetylierung.....	87
6.4. Methodologische Erwägungen und Integration der Befund.....	90
6.5. Schlussfolgerung und Ausblick.....	93
7. Zusammenfassung.....	95
8. Literaturverzeichnis.....	97
9. Abbildungsverzeichnis.....	106
10. Tabellenverzeichnis.....	108
11. Anhang.....	109
A.1. Curriculum vitae.....	109
A.2. Danksagung.....	110
A.3. Eigenständigkeitserklärung.....	111

II. Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Aqua bidest	Bidestilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
Bis-Tris	Bis(2-hydroxyethyl)amino-tris(hydroxymethyl)methan
bp	Basenpaare
ca.	circa
CBP	CREB-Bindeprotein
cdk4	Cyclin-abhängige Kinase 4
Cis	Cisplatin
CpG	Cytosin-phosphatidyl-Guanosin
DNA	Deoxyribonucleic acid
Dnase	Desoxyribonuklease
DNMT	DNA-Methyltransferasen
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
E6-Proteins	Human papilloma virus protein E6
FCS	Foetal Bovine Serum
FOXO	Forkhead-Transkriptionsfaktor
G0-Phase	Ruhephase des Zellzyklus
G1-Phase	Präsynthesephase des Zellzyklus
G2-Phase	Prämitotische Phase des Zellzyklus
GCN5	General control nonderepressible 5
H1	Histon H1
H2A	Histon H2A
H2B	Histon H2B
H3	Histon H3
H4	Histon H4
HAT	Histon-Acetyltransferasen
HDAC	Histon-Deacetylasen
H₂O	Wasser

II. Abkürzungsverzeichnis

HPV	human papilloma virus
HRP	Horseradish Peroxidase
HTCD-Puffer	Pellet resolve buffer
IgG	Immunglobulin G
ISS	Internationalen Staging-System
LDS	Lithium dodecyl sulfate
Lys9	Lysin 9
M-Phase	Mitosephase des Zellzyklus
MAPK p-38	Mitogen activated protein kinase p-38
MES	2-(N-morpholino) ethanesulfonic acid
Mittel	Geometrischer Mittelwert
n	Fallzahl
NaBu	Natriumbutyrat
NaCl	Natriumchlorid
NAD+	Nicotinamid-Adenin-Dinukleotid
NCS	Newborn calf serum
NSCLC	Non-small cell lung cancer
p	Irrtumswahrscheinlichkeit
p300	Histonacetyltransferase p300
p53	Tumorsuppressorprotein p53
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
PBS	Phosphate-Buffered Saline
PCAF	p300/CBP-associated factor
PCR	Polymerase chain reaction
Penstrep	Penicillin-Streptomycin
PP	Polypropylen
R0-Resektion	vollständige Resektion mit mikroskopisch tumorfreiem Rand
Rb	Retinoblastoma
RNA	Ribonucleic acid
RNAse	Ribonuklease
RPMI	Roswell Park Memorial Institute
S-Phase	Replikationsphase des Zellzyklus
SAHA	Suberoylanilide-hydroxamic-acid

II. Abkürzungsverzeichnis

SCLC	Small cell lung cancer
SD	Standardabweichung
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SEM	Geometrischer Standardfehler
Ser10	Serin 10
Ser14	Serin 14
Sig	Signifikanz
Sir	Sirtinol
Sir2	Sirtuin-1
Tab	Tabelle
TCA	Trichloroacetic acid
TFIID	Transcription factor II D
TNM	Tumor-Nodes-Metastasen
TSG	Tumorsuppressorgen
t-Test	Hypothesentest mit t-verteilter Testprüfgröße
UICC	International Union Against Cancer
VLE	Very low endotoxin

Einheiten

°C	Grad Celsius
cm, cm²	Zentimeter, Quadratzentimeter
g	Normalfallbeschleunigung
kDa	kiloDalton
M, mM, μM	molar, millimolar, mikromolar
mA	Milliampere
mg, μg, ng	Milligramm, Mikrogramm, Nanogramm
mL, μL	Milliliter, Mikroliter
mm, μm, nm	Millimeter, Mikrometer, Nanometer
N	Teilchenzahl
rpm	Umdrehungen pro Minute
V	Volt
%	Prozent

1. Einleitung

Das Bronchialkarzinom ist der weltweit am häufigsten zum Tode führende maligne Tumor. An der ungünstigen Prognose und der mittleren Lebenserwartung von ein bis zwei Jahren ab Diagnosestellung konnten bisher auch etablierte Therapieverfahren in vielfältigen Varianten nichts Wesentliches ändern. Eine Reihe von molekularen Veränderungen sind zentral an der Tumorentstehung und Progression beteiligt. Hierbei steht die Dysregulation des Zellzyklus an vorderer Stelle. Diese ist ihrerseits häufig an Fehlregulationen auf der Ebene des Genoms gekoppelt, und unter diesen wird epigenetischen Alterationen eine zentrale Rolle zugeschrieben.

Das Wissen um die genaue Funktion dieser Mechanismen und die damit verbundene Möglichkeit eines zielgerichteten Eingreifens in die multifaktorielle Tumorgenese stehen mit vielen erfolgversprechenden Ansätzen im Mittelpunkt der derzeitigen Forschungsbemühungen. In der vorliegenden Arbeit wird in Parallelität zu derzeit erprobten Therapiekonzepten an Zellkulturen geprüft, inwieweit auch eine etablierte Chemotherapie epigenetische Effekte auszulösen in der Lage ist.

2. Hintergrund der Untersuchung

2.1. Charakteristika des Bronchialkarzinoms

Das Bronchialkarzinom ist einer der häufigsten bösartigen Tumoren des Menschen. Die Bronchialkarzinome stellen eine heterogene Gruppe dar, die nach klinischen und histologischen Gesichtspunkten in zwei große Untergruppen eingeteilt wird: das kleinzellige- (small cell lung cancer, SCLC) und das nicht-kleinzellige Bronchialkarzinom (non-small cell lung cancer, NSCLC).

Die Gruppe der NSCLC, die etwa 80 % aller Bronchialkarzinome ausmacht, schließt das Plattenepithelkarzinom, das Adenokarzinom, das bronchioloalveoläre Karzinom und das großzellige Bronchialkarzinom mit ein. Die wesentlichen Charakteristika eines Bronchialkarzinoms werden im Folgenden aufgelistet:

- Fast ausschließlich Induktion durch Umweltfaktoren. An erster Stelle ist hier der Zigarettenrauch zu nennen.
- Ausgeprägte Metastasierungsneigung in den gesamten Organismus.
- Schnelle Resistenzentwicklung des Tumorgewebes gegenüber Chemotherapeutika und Bestrahlung.
- Maskierung der Tumorzellen und dadurch Vermeidung des Zugriffs durch das spezifische Immunsystem aufgrund des Fehlens körperfremder Erkennungsmerkmale.

2.2. Therapie des Bronchialkarzinoms

Die Therapie des Bronchialkarzinoms richtet sich nach der gewebetypischen Klassifikation (SCLC oder NSCLS) und der anatomischen Ausbreitung des Tumors. Die Stadieneinteilung wird nach dem Internationalen Staging-System empfohlen.

TNM-Klassifikation des Bronchialkarzinoms (UICC, 1997):

T	= Ausdehnung des Primärtumors
Tx	Primärtumor kann nicht sicher beurteilt werden, oder Nachweis von malignen Zellen im Sputum oder bei Bronchialspülungen, jedoch Tumor weder radiologisch noch bronchoskopisch sichtbar
T0	kein Anhalt für Primärtumor
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor ≤ 3 cm oder weniger in größter Ausdehnung, umgeben von Lungengewebe oder viszeraler Pleura, kein bronchoskopischer Nachweis einer Infiltration proximal eines Lappenbronchus (Hauptbronchus frei)
T2	Tumor mit wenigstens einem der folgenden Kennzeichen hinsichtlich Größe oder Ausbreitung: <ul style="list-style-type: none"> - > 3 cm in größter Ausdehnung - Hauptbronchus befallen (> 2 cm distal der Carina) - Infiltration der viszeralen Pleura - assoziierte Atelektase oder obstruktive Entzündung bis zum Hilus, jedoch nicht der ganzen Lunge
T3	<ul style="list-style-type: none"> - Tumor jeder Größe mit direkter Infiltration einer der folgenden Strukturen: Brustwand (einschließlich der Sulcus-superior-Tumoren), Zwerchfell, mediastinale Pleura, parietales Perikard - oder: Tumor im Hauptbronchus ≤ 2 cm distal der Carina, jedoch Carina selbst nicht befallen - oder: Tumor mit Atelektasen oder obstruktiver Entzündung der ganzen Lunge

2. Hintergrund der Untersuchung

T4	<ul style="list-style-type: none"> - Tumor jeder Größe mit Infiltration wenigstens einer der folgenden Strukturen: Mediastinum, Herz, große Gefäße, Trachea, Ösophagus, Wirbelkörper, Carina - oder: vom Primärtumor getrennte Tumorherde im gleichen Lappen - oder: Tumor mit malignem Pleuraerguß
N	= Befall der regionären Lymphknoten
Nx	regionäre Lymphknoten können nicht beurteilt werden
N0	keine regionären Lymphknotenmetastasen
N1	Metastase(n) im ipsilateralen peribronchialen und/oder ipsilateralen Hiluslymphknoten (einschließlich eines Befalls durch direkte Ausbreitung des Primärtumors in intrapulmonale Lymphknoten)
N2	Metastasen in ipsilateralen mediastinalen und/oder subkarinalen Lymphknoten
N3	Metastasen in kontralateralen mediastinalen, kontralateralen Hilus-, ipsi- oder kontralateralen Skalenus- oder supraklavikulären Lymphknoten
M	= Fernmetastasen
Mx	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen, einschließlich vom Primärtumor getrennter Tumorherde in einem anderen Lungenlappen (ipsi- oder kontralateral)

Tab. 1: TNM-Klassifikation des Bronchialkarzinoms (UICC, 1997)

2. Hintergrund der Untersuchung

Zuordnung des Bronchialkarzinoms nach TNM-Deskriptoren zum Internationalen Staging-System (UICC, 1997):

ISS-Stadium	TNM
Stadium IA	T1 / N0 / M0
Stadium IB	T2 / N0 / M0
Stadium IIA	T1 / N1 / M0
Stadium IIB	T2 / N1 / M0 T3 / N0 / M0
Stadium IIIA	T3 / N1 / M0 T1-T3 / N2 / M0
Stadium IIIB	T4 / N0-N2 / M0 T1-T4 / N3 / M0
Stadium IV	T1-T4 / N0-N3 / M1

Tab. 2: Zuordnung des Bronchialkarzinoms nach TNM-Deskriptoren zum Internationalen Staging-System (UICC, 1997)

Generell finden auch beim Bronchialkarzinom die drei klassischen Wege der Tumorthherapie Anwendung:

- Strahlentherapie
- Chemotherapie
- Chirurgie

Das kleinzellige Bronchialkarzinom wird in der Regel nicht primär operiert, sondern einer systemischen Therapie im Sinne einer Polychemotherapie zugeführt, die in der Regel die Gabe von Platinpräparaten umfasst. Zur lokalen Tumorkontrolle werden

2. Hintergrund der Untersuchung

zusätzlich eine Operation oder eine möglichst frühzeitige simultane Radiotherapie eingesetzt.

Beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom ist die primäre Option immer die Operation. Sofern Operabilität gegeben ist, sollte diese als R0-Resektion angestrebt werden. Für eine kurative Therapie ist die komplette Resektion des Primärtumors und eine umfassende mediastinale Lymphadenektomie Voraussetzung. Eine adjuvante systemische Therapie wird derzeit diskutiert. Bei inoperablen Patienten ist eine platinhaltige Polychemotherapie mit nachfolgender Radiotherapie angezeigt. Sofern dadurch ein Ansprechen im Sinne eines Downstaging zu erreichen war, ist die Operation danach erneut in Erwägung zu ziehen [Thomas *et al.*, 2002].

2.3. Wirkung von Cisplatin

Bei vielen Tumorerkrankungen sind Platinkomplexe die am häufigsten eingesetzten Chemotherapeutika in der Mono- und Kombinationstherapie. Als einer der wichtigsten und ältesten Vertreter dieser Komplexe ist Cisplatin aufgrund seines breiten Aktivitätsspektrums und seiner guten Wirksamkeit nach wie vor Grundbestandteil vieler Therapieschemata. Durch die mangelnde Selektivität für Tumorzellen kommt es jedoch häufig zu unerwünschten Nebenwirkungen, wie dosisabhängige, kumulative Nephro-, Neuro- und Ototoxizität, Übelkeit und Erbrechen.

Die wachstumshemmende Wirkung von Cisplatin auf Krebszellen ist seit 1965 bekannt. Cisplatin reagiert mit einigen zellulären Komponenten, die nukleophile Stellen aufweisen, wie DNA, RNA, Proteine, Membranphospholipide und thiohaltige Moleküle. Nach passivem Transport der Dichloroverbindung durch die Zellmembran kommt es infolge der niedrigen intrazellulären Chloridionenkonzentration im Zytoplasma zur Hydrolyse in Mono- und Diaquaspezies, welche die eigentlichen aktiven Substanzen der Alkylierung darstellen.

Der wichtigste Wirkungsmechanismus des Cisplatin innerhalb der Tumorzelle ist die relativ unspezifische Bindung an die DNA, wobei es verschiedene Möglichkeiten gibt:

- 1,2-intrastrand crosslink (wirkungsvollste Bindung)
- 1,3-intrastrand crosslink
- Interstrand crosslink
- Chelatbindung an eine Guaninbase
- DNA-Protein-Vernetzung

Hauptangriffstelle ist das N⁷-Atom des Purins von Guanin, woraus etwa 65 % aller gebildeten 1,2-intrastrand-Addukte resultieren [Hambley *et al.*, 1998].

2. Hintergrund der Untersuchung

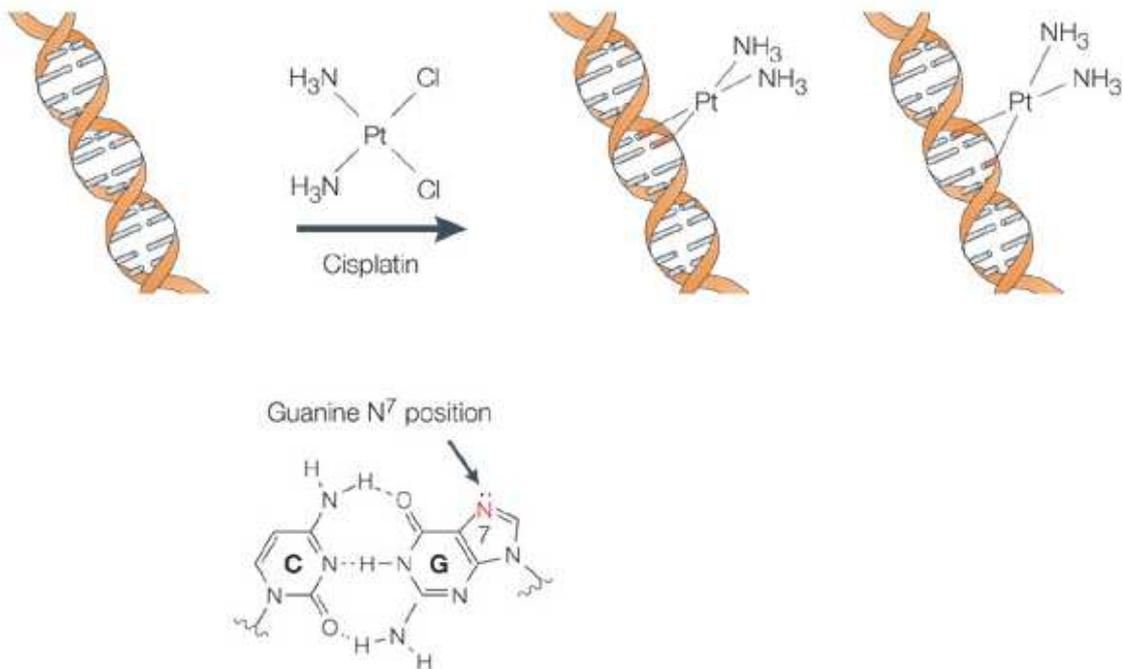


Abb. 1: Kovalente Bindung von Cisplatin an das N⁷-Atom des Purins von Guanin und Bildung von 1,2- oder 1,3-intrastrand crosslinks und Interstrand crosslinks [Wang & Lippard, 2005]

Als Folge kommt es zur DNA-Verkürzung, gestörter Basenstapelung, Verzerrung der Sekundärstruktur, sowie durch eine Entwindung der Doppelhelix zum Verlust der thermischen Stabilität. Transkription und Replikation sind nicht mehr möglich. Daher verharren Cisplatin-behandelte Zellen in der G₂-Phase des Zellzyklus. Apoptose und Nekrose als konsekutive oder zusätzliche Zellantwort sind besonders durch die 1,2-DNA-Addukte bedingt [Wang & Lippard, 2005]. Außer der Bildung von DNA-Addukten wurden in Tumorzellen nach Cisplatin-Gabe von einigen Autoren auch spezifische kovalente Histonmodifikationen beobachtet, wie sie für die epigenetische Regulation charakteristisch sind. Insbesondere sei hier eine Phosphorylierung von Serin 10 an H₃ und eine generelle Hyperacetylierung von H₄ erwähnt [Wang & Lippard, 2004]. Die Phosphorylierung wird möglicherweise über den MAPK p-38 Weg vermittelt, der in der therapeutischen Antwort auf Cisplatin-Gabe eine zentrale Rolle zu spielen scheint [Mansouri *et al.*, 2003]. Ebenso scheint eine Beteiligung von Histon-Deacetylasen beim Cisplatin-induzierten Zelltod zu bestehen [Matsushita *et*

2. Hintergrund der Untersuchung

al., 2005]. Da andererseits Histonmodifikationen unmittelbare Objekte anderer Formen der Tumorthherapie sind, die auf die histonmodifizierende Enzyme abzielen (siehe 2.5.4.), stellt sich die Frage, inwieweit eine konventionelle Cisplatin-Therapie mit derartigen Therapieansätzen interagieren kann.

2.4. Zellbiologie von Tumorzellen

Eine Tumorzelle zeigt vielfältige Veränderungen in grundlegenden zellulären und molekularen Prozessen. Diese Änderungen können sehr unterschiedlich ausfallen bzw. basiert sein, führen letztlich aber alle zum gleichen Ergebnis der Dysregulation des Zellzyklus. Hanahan und Weinberg (2000) haben sechs verschiedene Eigenschaften definiert, welche die meisten, wenn auch nicht alle, Tumore aufzeigen:

- Unabhängigkeit von Wachstumssignalen
- Insensitivität gegen Wachstumsinhibitoren
- Umgehung des programmierten Zelltods (Apoptose/Autophagie)
- Unbegrenztetes Replikationspotential
- Gewebeinvasion und Metastasierung
- Erhöhte Angiogenese

2.4.1. Faktoren unlimitierter Proliferation

Die Zellzahl wird über zwei verschiedene Mechanismen gesteuert:

- Zellproliferation
- Apoptose

DNA-Mutationen, welche die Funktion von Genen verändern, die an einem dieser Prozesse beteiligt sind, können zu unregulierter Proliferation führen. Die Entstehung und Progression maligner Tumore wird heute als ein mehrstufiger Prozess gesehen, bei dem es im Laufe der Zeit zu einer Akkumulation genetischer Defekte kommt (Vogelstein Modell) [Hanahan & Weinberg, 2000]. Aber nicht nur genetische Defekte im Sinne somatischer Mutationen, sondern auch epigenetische, dauerhaft regulatorische Veränderungen beeinflussen die Expression bestimmter Gene und

führen zum Erwerb persistenter, neuer zellulärer Eigenschaften. Durch klonale Expansion derartiger transformierter Zellen kommt es letztlich zur Entstehung eines malignen Tumors.

2.4.2. Onkogene und Tumorsuppressorgene

Aufgrund ihrer primären Wirkung auf das Zellwachstum werden die tumorassoziierten Gene in Onkogene (proliferationsfördernd) und in Tumorsuppressorgene (proliferationshemmend) eingeteilt.

Die proliferationsfördernden Onkogene entstehen aus Proto-Onkogenen. Onkogene wirken dominant, das heißt, bereits die Mutation nur eines der beiden homologen Allele führt zu einem Funktionsgewinn und zur Ausbildung des karzinogenen Phänotyps [Bishop, 1983a, b]. Onkogene fungieren üblicherweise als Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, sowie als Signalproteine, Transkriptionsfaktoren und Apoptoseinduktoren.

Die Tumorsuppressorgene (TSG) haben einen hemmenden Einfluss auf die Zellproliferation und werden durch genetische Alterationen inaktiviert. Zu diesem Funktionsverlust kommt es aber erst dann, wenn beide Allele betroffen sind („Two-hit“-Hypothese von Knudson, 1971). Tumorsuppressorgene können direkt in die Kontrolle der Zellproliferation eingebunden sein, indem sie an der Regulation der Zellzyklus-Kontrollpunkte („checkpoints“) teilnehmen, oder einen indirekten Einfluss auf das Zellwachstum haben, indem sie die Integrität des Genoms sichern (Kontrolle der DNA-Reparatur und der mitotischen Rekombination).

Letztendlich führen die tumorassoziierte Aktivierung von Onkogenen und die Suppression von Tumorsuppressorgenen zum gleichen Endergebnis: Störung des Gleichgewichts zwischen Zellproliferation und programmiertem Zelltod (Apoptose). Durch diese Störung wird die Zellzykluskontrolle aufgehoben, und es kommt zu unkontrolliertem Wachstum.

2. Hintergrund der Untersuchung

Alle Onkogene und Tumorsuppressorgene wirken innerhalb weniger entscheidender Signalwege, die dieses Gleichgewicht moderieren. Dazu gehören die Phosphotyrosin-Kinase-Signalwege, die die Stimulation der Zellproliferation durch Wachstumsfaktoren vermitteln (z.B. MAPK-Signalweg), die Zellzyklus-Regulation im engeren Sinne, sowie die pro- und antiapoptotischen Signalwege. Viele tumorassoziierte Gene wirken auch innerhalb mehrerer Signalwege, wie z.B. der p53-Transkriptionsfaktor, der bei DNA-Schädigung sowohl für einen Zellzyklus-Arrest und eine DNA-Reparatur sorgen als auch eine Apoptose auslösen kann [Oren, 2003; Prives & Hall, 1999].

Eine Fehlregulation des Zellzyklus kann eine erhöhte Proliferationsrate hervorrufen. Im Verlauf des Zellzyklus gibt es zwei wichtige Kontrollpunkte, an denen die Integrität des Genoms überwacht wird. Am G1/S-Kontrollpunkt in der späten G1-Phase wird die Integrität der DNA vor deren Replikation kontrolliert. Wurde die DNA geschädigt, so wird entweder der Eintritt in die S-Phase durch das p53-Protein verzögert, um eine Reparatur der Defekte zu ermöglichen, oder die Zelle wird durch Apoptose eliminiert. Andererseits werden am G2/M-Kontrollpunkt Zellen mit beschädigter DNA bzw. fehlerhaft verlaufenen Mitosen aussortiert [Sherr, 2000; Blagosklonny & Pardee 2002].

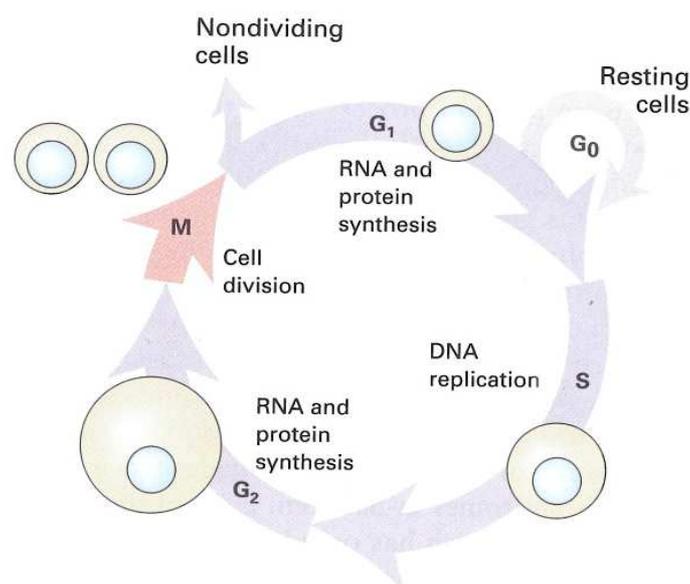


Abb. 2: Phasen des Zellzyklus [Lodish *et al.*, 2004]

2. Hintergrund der Untersuchung

Zu den Proteinen, die den wichtigen Übergang vom Ruhezustand (G0 oder G1) in die Replikationsphase (S) des Zellzyklus kontrollieren, gehören sowohl Tumorsuppressorgene (beispielsweise das Retinoblastoma(Rb)-Protein) [Classon & Harlow, 2002], wie auch Onkogene (beispielsweise die Cyclin-abhängige Kinase 4 (cdk4) oder das regulatorische Protein Cyclin D) [Tallen *et al.*, 2000; Martin, 2001]. Nahezu alle Tumore zeigen eine fehlerhafte Kontrolle der G1-Progression und eine verminderte Rate der Detektion von DNA-Schäden an den Zellzyklus-kontrollpunkten. Dies führt einerseits zu einer ungehemmten Proliferation von Zellen, andererseits zu einer Akkumulation genetischer Alterationen [Malumbres & Carnero, 2003].

2.5. Epigenetik von Tumorzellen

Epigenetische Veränderungen befinden sich nicht „in“, sondern gewissermaßen „auf“ (epi –griechisch für „auf“) der in der Abfolge der vier DNA-Basen (Adenin, Cytosin, Guanin, Thymin) enthaltenen Erbinformation. Epigenetische Veränderungen gehen also nicht auf Abweichungen in der DNA-Sequenz zurück, sondern basieren auf kovalenten, nicht mutationsartigen Veränderungen der DNA selbst oder chemischen Modifikationen der mit dieser verbundenen Proteine (Histone). Alle diese Änderungen werden durch bestimmte Enzyme vermittelt und führen zu einer veränderten Zugänglichkeit der DNA für die Transkriptionsmaschinerie bzw. einer unterschiedlichen Bindung transkriptionsregulierender Faktoren. Dies kann entweder zu einer Genaktivierung oder einer Genrepression führen.

Auf epigenetischer Ebene gehören die DNA-Methylierung und die kovalenten Histonmodifikationen zu den wichtigsten Regulationsmechanismen der Genexpression. Histonmodifikationen sind hierbei besonders vielfältiger Natur. Die offensichtlichsten dieser Veränderungen machen sich in einer unterschiedlich dichten Packung der Chromatinstruktur bemerkbar, wie sie auch der Unterscheidung zwischen Euchromatin und Heterochromatin zugrunde liegt. Neben den somatischen Mutationen, eventuell auf der Basis genetischer Dispositionen, nimmt man heute an, dass epigenetische Veränderungen bei der Entstehung und dem Wachstum von Tumoren eine entscheidende Rolle spielen.

Ein besonderes Potential für die Tumorentwicklung haben epigenetische Änderungen auch deshalb, weil sie offenbar in gewissem Maße über die Zellteilung hinaus an Tochterzellen weitergegeben werden können, so als handelte es sich um somatische Mutationen. Daher kann man auch davon ausgehen, dass die entsprechenden Dysregulationen nicht von jeder Generation der Tumorzellen aufs Neue akquiriert werden müssen. Das lässt entsprechende epigenetische Alterationen im Prinzip als ähnlich gefährlich erscheinen wie somatische Mutationen. Daher sollten Therapien, die dort eingreifen, auch das Potential haben, Zellen dauerhaft in ihrem Proliferationsverhalten zu verändern.

2.5.1. DNA-Methylierung

Unter DNA-Methylierung versteht man die Übertragung von Methylresten auf Nukleobasen der DNA. Die Methylierung erfolgt nur an Cytosinen, die in 5'-Position zu einem Guanin liegen, in Form sogenannter CpG-Dinukleotide. Diese sind dadurch ausgezeichnet, dass aufgrund der Basenpaarung auf dem Gegenstrang in Gegenrichtung ebenfalls ein Cytosin in 5'-Position zu einem Guanin liegt und dieses in der Regel ebenfalls methyliert ist.

Die DNA-Methylierung wird durch mindestens vier unterschiedliche DNA-Methyltransferasen (DNMT1, 2, 3a, 3b) katalysiert, wobei DNMT1 als für die Beibehaltung bereits vorhandener Methylierungsmuster nach der Replikation verantwortlich gilt, wohingegen DNMT 3a und 3b eine *de novo*-Methylierung zugeschrieben wird [Attwood *et al.*, 2002].

CpGs sind nicht regellos über das Genom verstreut, sondern befinden sich überwiegend konzentriert in Regionen, in denen sie gehäuft vorkommen, den sog. CpG-Inseln. Diese sind häufig in der Promotorregion von Genen gelegen. Insbesondere wurden sie auch in den Promotorregionen von Genen nachgewiesen, die an der Tumor-Suppression beteiligt sind [Bird, 1986].

Unter normalen Bedingungen sind etwa 70 % aller CpGs im Genom methyliert. Der Großteil der nicht methylierten CpGs befindet sich in den CpG-Inseln der Promotorregionen. Die Tatsache, ob ein Gen in seiner regulatorischen Promotorregion methyliert ist oder nicht, trägt entscheidend dazu bei, ob dieses Gen exprimiert wird, oder nicht. Eine Hypermethylierung im Promotorbereich bewirkt in der Regel eine Gen-Inaktivierung („gene silencing“), eine Hypomethylierung eine Gen-Aktivierung [Jones & Baylin, 2002]. An der Inaktivierung sind möglicherweise sterische Hindernisse durch die Methylgruppen beteiligt, doch spielen auch spezifische Bindeproteine bzw. Erkennungsgruppen für methylierte DNA auf solchen Proteinen eine wichtige Rolle; diese können auch die Genaktivierung vermitteln.

Als wichtigste epigenetische Veränderungen in Tumorzellen sind einerseits eine genomweite Hypomethylierung, andererseits jedoch eine Hypermethylierung im Promotorbereich einer Reihe von Genen zu konstatieren. Während die genomweite Hypomethylierung mit der Aktivierung einiger Onkogene assoziiert wird, gilt die Hypermethylierung regulatorischer Genabschnitte, die eine Transkriptionshemmung bewirkt, als mögliche Ursache der Inhibition von Tumorsuppressorgenen [Robertson, 2001; Bowman *et al.*, 2006]. In diesem Sinne können die gegenläufigen DNA-Änderungen auf der Basis der gegenläufigen Effekte der beiden Genklassen auf den Zellzyklus letztlich zu einem synergistischen Effekt führen.

2.5.2. Chromatinstruktur

Die DNA eukaryontischer Zellen liegt im Zellkern in einer verdichteten Form, dem Chromatin vor. Am Chromatin ist eine Vielzahl von Proteinen beteiligt, doch ist die funktionelle Basiseinheit des Chromatins das Nukleosom, mittels dessen die DNA auf der untersten Ebene organisiert ist. Nukleosomen werden von Histonen gebildet. Hierbei sind fünf Haupttypen von Histonen beteiligt: H2A, H2B, H3, H4 und H1.

Histone sind sehr basische Proteine mit vielen positiv geladenen Aminosäuren und interagieren daher gut mit dem negativ geladenen Ribose-Phosphat-Gerüst der DNA [Hong *et al.*, 1993; Lee *et al.*, 1993]. Je zwei Moleküle H2A, H2B, H3 und H4 bilden ein Histon-Oktamer. Um dieses Oktamer sind 146 bp (Basenpaare) DNA in etwa 1,8 Windungen gewunden. Ein Histon-Oktamer und die assoziierte DNA stellen zusammen ein Nukleosom dar (etwa 11 nm Durchmesser). Zwischen den benachbarten Nukleosomen befindet sich die „linker“-DNA, die eine unterschiedliche Länge einnehmen kann und mehr oder weniger mit dem Histon H1 assoziiert ist. Zusammen mit den vorzugsweise N-terminalen Enden der Histone (tails), die aus dem Nukleosom herausragen ergibt sich die Struktur einer gedrehten Perlenkette (30 nm-Fiber). An der Ausbildung darauf aufbauender, höherer Chromatinstrukturen sind weitere Chromatinproteine beteiligt.

2. Hintergrund der Untersuchung

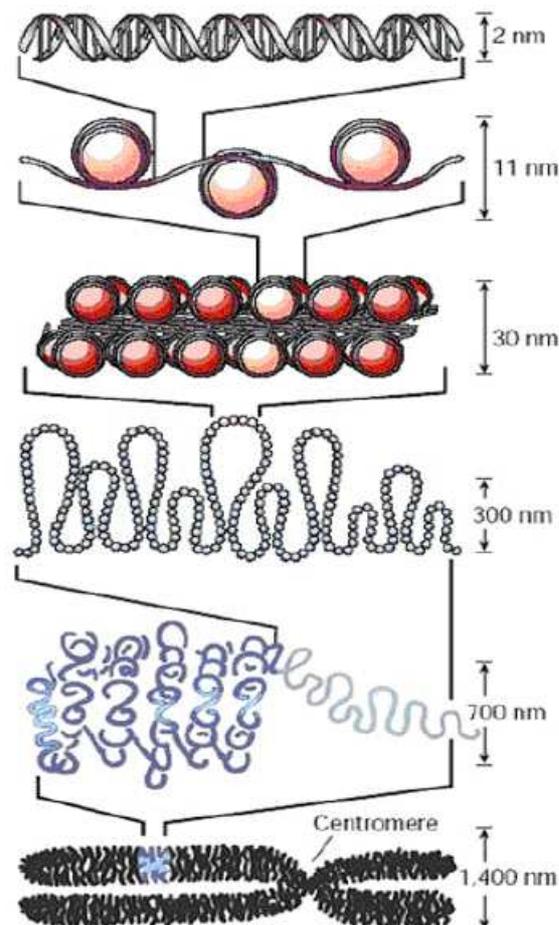


Abb. 3: Hierarchie konsekutiver Packungsstufen der DNA [Felsenfeld & Groudine, 2003]

Das Chromatin ist in seiner Struktur jedoch nicht statisch, sondern sehr variabel. Die flexiblen N-terminalen Enden der Histonproteine, die aus dem Nucleosom herausragen, spielen eine wichtige Rolle für die regulatorische Funktion, da sie vielfältig chemisch modifiziert werden können. Die post-translationalen Modifikationen der Histonproteine beeinflussen die Konformation des Chromatins, die Zugänglichkeit der DNA sowie die Bindungs- und Interaktionsfähigkeit einer Vielfalt transkriptioneller Faktoren und damit die transkriptionelle Aktivität von Genen.

Im Allgemeinen lässt sich sagen, dass mit einer kondensierten Chromatinstruktur eine Repression der Transkription verbunden ist und eine offene Konformation die

Transkription korrespondierender Gene begünstigt [Jenuwein & Allis, 2001]. Wichtig bleibt jedoch die Feststellung, dass vermutlich die Wirkung von Histonmodifikationen nur teilweise auf rein sterischen Effekten beruht. Eine zentrale Rolle für die Transkriptionsaktivierung spielen auch sog. ATP-abhängige nucleosome remodeling complexes, die für die Verschiebung der Nucleosomen auf der DNA verantwortlich sind, im Zusammenspiel mit Histon-modifizierenden Enzymen [Becker & Horz, 2002; Cairns, 2005; Eberharter *et al.*, 2005].

2.5.3. Histonmodifikationen

Zu den posttranslationalen Veränderungen an den Histonproteinen gehören die Acetylierung [Zhang *et al.*, 2002], Methylierung [Zhang & Reinberg, 2001; Sims *et al.*, 2003], Phosphorylierung [Nowak & Corces, 2004], Ubiquitylierung [Zhang, 2003], Biotinylierung [Camporeale *et al.*, 2004], Sumoylierung [Nathan *et al.*, 2003] und Ribolysierung [Golderer & Grobner, 1991].

Die zurzeit am besten charakterisierten Histonmodifikationen sind die Acetylierung, Methylierung und Phosphorylierung.

2.5.3.1. Histonacetylierung

Die Acetylierung bzw. Deacetylierung findet an Lysinen statt [Zhang *et al.*, 2002]. Durch die Acetylierung kommt es zu einer Neutralisation der positiv geladenen Histonreste, was deren Affinität zur negativ geladenen DNA herabsetzt [Hong *et al.*, 1993]. Somit wird die Chromatinstruktur aufgelockert und zugänglich für transkriptionelle Regulatorproteine. Die Acetylierung von Histonproteinen korreliert also in der Regel mit einer erhöhten transkriptionellen Aktivität [Marmorstein & Roth, 2001].

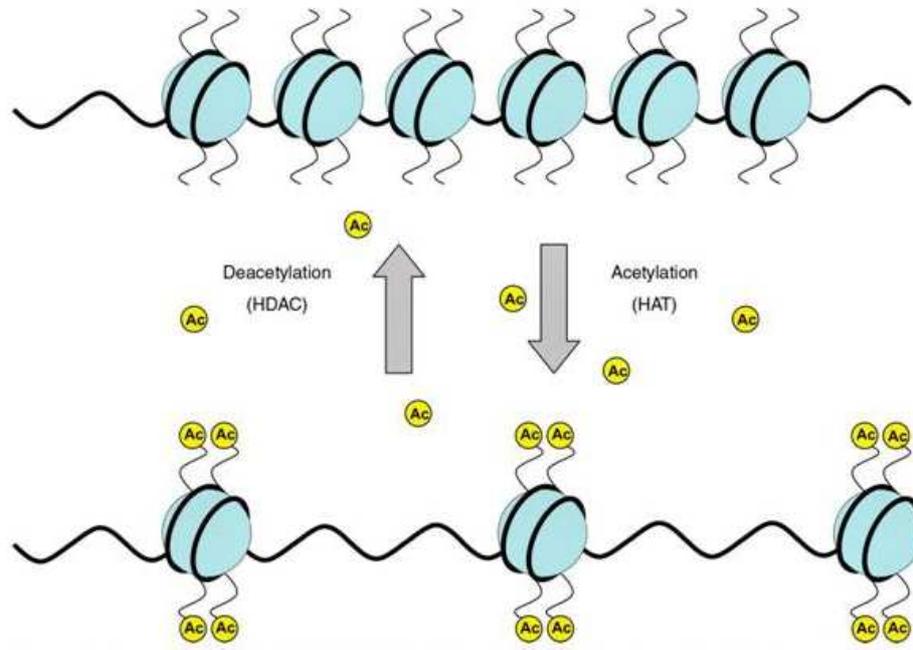


Abb. 4: Acetylierung und Deacetylierung von Histonen geht unter Anderem mit Änderungen der Chromatinstruktur einher [Pons *et al.*, 2009]

Umgekehrt ergibt sich aus der Deacetylierung der Lysinreste eine herabgesetzte Zugänglichkeit der DNA für Transkriptionsaktivatoren. Die Deacetylierung geht somit in der Regel mit einer transkriptionellen Repression von Zielgenen einher [Davie, 1998; Peterson & Laniel, 2004]. Die Acetylierung lässt sich zum einen spezifisch für bestimmte Lysinreste angeben, zum anderen global, insbesondere für die Histone H3 und H4. In vielen Fällen unterliegt die Acetylierung relativ raschen Änderungen, und es ist nicht klar, inwieweit derartige Informationen über die Zellteilung hinaus weitergegeben werden können.

2.5.3.2. Histone-methylierung

Die Histone-methylierung findet sowohl an Lysin- als auch an Argininen statt. Hierbei können die Lysine und Arginine nicht nur einmal, sondern in unterschiedlichem Maße methyliert werden. Lysine können maximal drei, Arginine maximal zwei

Methylgruppen beherbergen (Mono-, Di- und Trimethylierung) [Zhang & Reinberg, 2001]. Verglichen mit der Acetylierung scheint die Di- und Trimethylierung, beispielsweise von H3 an Lysin 9, längerfristig aufrechterhalten werden zu können und sogar über die Zellteilung hinaus weitergegeben zu werden [Lau *et al.*, 2004].

2.5.3.3. Histonphosphorylierung

Die Phosphorylierung von Histonen erfolgt an Serinen und hat ebenfalls regulatorische Funktion. Gut untersucht ist die Phosphorylierung von Serin 10 am Histon H3. Sie ist zellzyklusabhängig und kann daher als Mitosemarker dienen. Die Phosphorylierung von H3Ser10 nimmt von der Prophase bis zur Metaphase hin zu und zur Telophase hin wieder ab [Nowak & Corces, 2004]. Umgekehrt wurde die Phosphorylierung des Serins 14 auf dem Histon H2B, die an der nukleären Kondensation beteiligt ist, als Apoptosemarker bzw. als Antwort auf DNA-Doppelstrangbrüche beschrieben [Cheung *et al.*, 2003; Fernandez-Capetillo *et al.*, 2004; Ahn *et al.*, 2006].

2.5.4. Histonmodifizierende Enzyme

2.5.4.1. Histon-Acetyltransferasen und Histon-Deacetylasen

Das dynamische Gleichgewicht zwischen der Acetylierung und der Deacetylierung von Histonen wird von zwei Enzymfamilien, den Histon-Acetyltransferasen (HAT) [Ogryzko *et al.*, 2001; Marmorstein & Roth, 2001] und den Histon-Deacetylasen (HDAC) [Grozinger & Schreiber, 2002; Marks *et al.*, 2003; de Ruijter *et al.*, 2003] reguliert. Bemerkenswert ist, dass einige bekannte transkriptionale Koaktivatoren, wie CBP/p300 [Ogryzko *et al.*, 1996], PCAF/GCN5 [Yang & Wang, 1996] und TFIID [Mizzen *et al.*, 1996], Histonacetyltransferase-Aktivität besitzen. HATs katalysieren nicht nur die Übertragung von aktivierten Acetylgruppen auf N-terminale Lysinreste

von Histonproteinen, sondern auch auf andere, nicht-Histonproteine, wie z.B. das Tumorsuppressorprotein p53 [Wang *et al.*, 2003; Gu *et al.*, 2004].

Bei den HDACs unterscheidet man drei Enzymklassen. Klasse I umfasst HDAC 1, 2, 3 und 8, die in den meisten Zelltypen exprimiert werden und homologe katalytische Domänen besitzen. Die Klasse II umfasst HDAC 4, 5, 7 und 9, die nur in bestimmten Geweben vorkommen und Homologien in katalytischen und regulatorischen Domänen aufweisen. Die dritte HDAC-Klasse wird von den NAD⁺-abhängigen Sirtuinen des Typs Sir2 gebildet [Marmorstein, 2004]. Außerordentlich interessant zum Verständnis regulatorischer Vernetzungen innerhalb der Zelle erscheint, dass – ebenso wie Acetyltransferasen –zumindest die Histon-Deacetylasen der Klasse III (Sirtuine) in ihrer Aktivität nicht auf Histonproteine beschränkt sind, sondern dass sie auch andere Proteine deacetylieren, wie z.B. das Tumorsuppressorprotein p53 [Vaziri *et al.*, 2001; Langley *et al.*, 2002] und die FOXO-Transkriptionsfaktoren (forkhead transcription factors) [van der Horst *et al.*, 2004; Motta *et al.*, 2004].

2.5.4.2. Histon-Methyltransferasen

Die Histonmethylierung wird über spezifische Histon-Methyltransferasen katalysiert [Trievel, 2004]. Außerdem sind Histon-Demethylasen [Forneris *et al.*, 2005; Whetstine *et al.*, 2006] und einige andere Proteine wie Transkriptionsrepressoren und Onkogene bekannt [Klose *et al.*, 2006; Cloos *et al.*, 2006], die eine Demethylase-Aktivität aufzeigen. Diese Demethylasen arbeiten zumindest teilweise auf der Basis der Erkennung anderer, koordinierter Histonmodifikationen und kommunizieren hierbei mit den Histon-Deacetylasen [Lee *et al.*, 2006] in Übereinstimmung mit dem Befund einer engen Kopplung zwischen Acetylierung und Methylierung [Sarg *et al.*, 2004].

2.6. Epigenetische therapeutische Ansätze

Die Tatsache, dass epigenetische Mutationen im Gegensatz zu genetischen Mutationen reversibel sind, eröffnet völlig neuartige Möglichkeiten in der Tumorthherapie. Der Vorteil epigenetischer Mutationen besteht darin, dass nicht alle betroffenen Zellen durch Operation, Bestrahlung oder Chemotherapie beseitigt, sondern lediglich die Veränderungen der Zellen rückgängig gemacht werden müssten.

2.6.1. DNA-Methyltransferase-Inhibitoren

Zu Beginn einer Tumorerkrankung kann man häufig eine übermäßige DNA-Methylierung von Tumorsuppressorgenen beobachten, wodurch diese Gene ausgeschaltet werden. Durch eine Blockierung der für die DNA-Methylierung zuständigen Enzyme, könnten die Tumorsuppressorgene wieder reaktiviert werden. Die Hemmung der Methylierung stellt einen universellen Ansatz zur Therapie vieler Tumorentitäten dar. Ein Wirkstoff, der DNA-Methyltransferase-Inhibitoraktivität besitzt, ist in den Vereinigten Staaten seit 2004 bereits zugelassen (Azacytidin). Er ist jedoch äußerst toxisch und kann daher nur sehr beschränkt eingesetzt werden [Lyko & Brown, 2005].

2.6.2. Histon-Deacetylase-Inhibitoren

Ein weiterer potentieller epigenetischer Angriffspunkt einer zielgerichteten Tumorthherapie sind die Histon-Deacetylasen.

Eine verstärkte HDAC-Aktivität in Tumorzellen führt zu einer vermehrten Deacetylierung von Histonproteinen. Daraus ergibt sich eine Veränderung des Expressionsmusters von Genen, die entscheidende Funktionen in der

2. Hintergrund der Untersuchung

Zellzykluskontrolle und der Apoptose-Signaltransduktion innehaben, so dass eine unkontrollierte Zellproliferation resultiert.

Eine Vielzahl von Substanzen ist in der Lage, Histon-Deacetylasen in ihrer Aktivität zu blockieren. Diese sogenannten Histon-Deacetylase-Inhibitoren können durch eine Erhöhung des Acetylierungsstatus von Histonproteinen die transkriptionelle Regulation dieser Gene wiederherstellen. Die generelle antineoplastische Aktivität von HDAC-Inhibitoren wird auf die Aktivierung von Differenzierungsmechanismen, die Inhibition des Zellzyklus und die Apoptoseinduktion in maligne transformierten Zellen zurückgeführt. Die Proliferationshemmung und Induktion von Differenzierung durch HDAC-Inhibitoren konnte bereits in einer Reihe von Leukämien und soliden Tumoren nachgewiesen werden [Marks *et al.*, 2000, 2003]. Die Tatsache, dass Tumorzellen auf HDAC-Inhibitoren wesentlich sensitiver zu reagieren scheinen, als normale Zellen, stellt einen enormen Vorteil für potentielle Chemotherapeutika dar [Biel *et al.*, 2005].

Hemmstoffe der Klasse I und II HDACs:

- Kurzkettige Fettsäuren: z.B. Natriumbutyrat, Valproinsäure
- Hydroxaminsäuren: z.B. Trichostatin A, SAHA
- Synthetische Benzamide: z.B. Entinostat
- Zyklische Tetrapeptide: z.B. Trapoxin
- Ketone: z.B. Trifluormethyl-Ketone

Hemmstoffe der Klasse III HDACs (Sirtuine):

- Sirtinol
- Nicotinamide

3. Ziel der Arbeit

Ziel der Arbeit ist es, die Wirkung von Cisplatin und den Histon-Deacetylase-Inhibitoren Natriumbutyrat und Sirtinol auf kovalente Histonmodifikationen in menschlichen Zellen zu untersuchen.

Hierbei soll nicht nur die Wirkung der einzelnen Substanzen, sondern vor allem auch ihrer verschiedenen Kombinationsmöglichkeiten erfasst werden, da die Frage, inwieweit die Cisplatinwirkung direkt oder indirekt über kovalente Histonmodifikationen vermittelt wird und inwieweit eine Kombinationstherapie von Cisplatin und HDAC-Inhibitoren sinnvoll ist, von besonderem pharmakologischem Interesse ist.

Die Versuche werden an etablierten Tumorzelllinien und einer immortalisierten Bronchialepithelzelllinie durchgeführt. Bestimmt werden soll zum einen das Ausmaß der globalen Acetylierung von H3 und H4 als potentieller Indikator transkriptioneller Aktivität [He & Lehming, 2003], zum anderen die Phosphorylierung von Serin 10 in H3 als möglicher Mitosemarker [Wang & Lippard, 2004], sowie die für die Apoptose charakteristische Phosphorylierung von Serin 14 in H2B [Fernandez-Capetillo *et al.*, 2004; Cheung *et al.*, 2003] und die generell regulatorisch bedeutsame Trimethylierung von Lysin 9 in H3 [Peterson & Laniel, 2004; He & Lehming, 2003].

4. Material und Methoden

4.1. Verwendete Zelllinien

Bezeichnung	Herkunft	Bezugsquelle
BEAS-2B	Humanes gesundes Bronchialepithel	Prof. Dr. A. Gillisen, Universität Bonn
EPLC-32M1	Humanes mittelmäßig differenziertes Plattenepithelkarzinom der Lunge	Dr. G. Jaques, Universität Marburg
HCC827	Humanes epitheliales Adenokarzinom der Lunge	Dr. A. Gazdar und Dr. J. Minna, University of Texas, Dallas

Tab. 3: Bezeichnung, Herkunft und Bezugsquelle der verwendeten Zelllinien

4.2. Zellkultur und Expositionsschema

4.2.1. Kultivierung der Zelllinien

- Gewebekulturflaschen: Cellstar, Greiner Bio-one, 75 cm², 250 mL
- Zellkulturmedium: VLE RPMI 1640 Medium (1x), Biochrome
- Mediumzusätze:
 - Penstrep = Penicillin-Streptomycin, GIBCO, Invitrogen
 - Fungizone, Amphotericin B, GIBCO, Invitrogen
 - L-Glutamine, PAA
 - NCS = Newborn Calf Serum, PAA
 - FCS = Foetal Bovine Serum, GIBCO, Invitrogen
- Zusammensetzung der verwendeten Komplettmedien:
 - 500 mL VLE RPMI 1640 Medium(1x)
 - 50 mL NCS (für BEAS-2B und EPLC-32M1)
 - bzw. 100 mL FCS (für HCC827)
 - 1,2 mL Penstrep
 - 2,4 mL Fungizone
 - 5 mL L-Glutamine

Alle Zelllinien wurden in einem Brutschrank (Hera cell 240, Heraeus) in wasserdampfgesättigter Atmosphäre in 5 % CO₂ bei 37°C kultiviert. Pro Zellkulturflasche wurden jeweils 10 mL Komplettmedium verwendet. Sämtliche Arbeiten wurden unter einer Sicherheitswerkbank (Hera safe, Kendro) durchgeführt.

4.2.2. Passagierung der Zellen

- Zentrifugenröhrchen: PP-Röhrchen, 50 mL, Greiner Bio-one
- EDTA 0,02 % Solution, Sigma

Bei Erreichen der Konfluenz (80-100 %) erfolgte die Passage der Zellen. Falls die gewünschte Konfluenz noch nicht erreicht war, erfolgte nach 2-3 Tagen lediglich ein Mediumwechsel. Zum Teilen der Zellen wurde das Medium mit Hilfe einer Pipette aus der Kulturflasche abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen mit 5 mL EDTA Lösung im Brutschrank inkubiert. Je nach Zelllinie war eine Inkubationsdauer von 5-10 Minuten nötig, um die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche zu lösen. Der Ablösungsvorgang wurde durch vorsichtiges Klopfen auf die Kulturflasche unterstützt. Das EDTA wurde nach dem Ablösen der Zellen durch Zugabe von 5 mL NCS bzw. FCS abgepuffert. Die gewonnene Zellsuspension wurde in ein Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 Minuten bei 20°C und 220 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das gewonnene Zellpellet wurde in 10 mL Kompletmedium sorgfältig resuspendiert. Ein Aliquot wurde entnommen und mittels einer Neubauer-Zählkammer die Zellzahl bestimmt. Anschließend erfolgte die Neuaussaat der Zellen in der gewünschten Anzahl.

4.2.3. Exposition der Zellen

- Cisplatin, HEXAL
- Histon-Deacetylase-Inhibitoren:
 - Sodium butyrate (Natriumbutyrat), Fluka
 - Sirtinol, Sigma
- Verwendete Arbeitskonzentrationen:
 - Die Cisplatin-Arbeitskonzentration wurde zu 10 μ M gewählt, da bei Patienten unter Therapie initial eine Cisplatin-Serum-Konzentration von 20 μ M erreicht wird, die nach zwei Stunden auf ca. 7 μ M abfällt [Go & Adjei, 1999]
 - Die Natriumbutyrat-Arbeitskonzentration wurde zu 5 mM gewählt
 - Die Sirtinol-Arbeitskonzentration wurde zu 20 μ M gewählt

Es wurde jeweils eine ausreichende Menge des benötigten Mediums mit der entsprechenden Arbeitskonzentration des Agens bzw. einer Kombination der Agenzien versetzt.

Für eine Versuchsreihe wurden jeweils sieben Kulturschalen einer Passage einer Zelllinie herangezogen, wobei eine der Schalen der Weiterkultivierung diente. Insgesamt wurden von jeder der drei Zelllinien sieben aufeinander folgende Passagen mit den Agenzien inkubiert.

4.2.4. Expositionsschema

Die Exposition der Zellen wurde folgendermaßen vorgenommen:

Zu Beginn wurde jeweils eine der sieben Kulturschalen mit Cisplatin bzw. Natriumbutyrat für acht Stunden inkubiert. Nach Ablauf der acht Stunden erfolgte in diesen Kulturschalen ein Wechsel des Inkubationsmediums. Die zuvor für acht Stunden mit Cisplatin inkubierte Schale wurde für weitere acht Stunden mit Natriumbutyrat inkubiert und umgekehrt. Des Weiteren wurden nach den ersten acht Stunden die restlichen Kulturschalen inkubiert. Hier erfolgte die Inkubation jeweils mit Cisplatin bzw. Natriumbutyrat alleine sowie mit einer Kombination dieser beiden Agenzien. Als Negativkontrolle wurde in einer Kulturschale ausschließlich ein Mediumwechsel für die letzten acht Stunden durchgeführt.

	Brutschale 1	Brutschale 2	Brutschale 3	Brutschale 4	Brutschale 5	Brutschale 6
1.-8. Stunde					NaBu	Cisplatin
8.-16. Stunde	Medium- wechsel	NaBu	Cisplatin	Kombina- tion aus NaBu und Cisplatin	Cisplatin	NaBu

Tab. 4: Expositionsschema

Eine weitere Versuchsreihe wurde nur mit der EPLC-32M1 Zelllinie durchgeführt, wobei der HDAC-Inhibitor Natriumbutyrat durch Sirtinol ersetzt wurde, der übrige Versuchsaufbau blieb bestehen.

4.2.5. Abernten der exponierten Zellen

- Kryos: Cellstar, Greiner Bio-one

Nach Ablauf der 16 Stunden Inkubationszeit wurden die Zellen geerntet. Das Medium wurde aus den Kulturschalen mit Hilfe einer Pipette abgesaugt und getrennt in Zentrifugenröhrchen für die später folgende Zellzählung aufgefangen, um eventuell vom Brutschalenboden abgelöste Zellen bei der Zählung nicht zu unterschlagen. Anschließend wurden die Zellen mit 5 mL EDTA-Lösung im Brutschrank inkubiert. Je nach Zelllinie war eine Inkubationsdauer von 5-10 Minuten nötig, um die Zellen vom Boden der Zellkulturflasche zu lösen. Der Ablösungsvorgang wurde durch vorsichtiges Klopfen auf die Kulturflasche unterstützt. Das EDTA wurde danach durch Zugabe von 5 mL NCS bzw. FCS abgepuffert. Die gewonnene Zellsuspension wurde ebenfalls in die entsprechenden Zentrifugenröhrchen überführt. Danach wurde die Suspension für 5 Minuten bei 4°C und 220 g zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Das gewonnene Zellpellet wurde in 10 mL Komplettmedium sorgfältig resuspendiert. Ein Aliquot wurde entnommen und mittels einer Neubauer-Zählkammer in Einfachbestimmung ausgezählt. Es erfolgte hierbei keine Differenzierung zwischen lebenden und toten Zellen. Zur Lagerung der Zellen wurde die Suspension nach der Zellzählung erneut für 5 Minuten bei 4°C und 220 g zentrifugiert, decantiert, das Pellet in 1 mL Komplettmedium resuspendiert und in Kryos überführt. Die Kryos wurden ebenfalls bei 4°C und 220 g abzentrifugiert und das entstandene Pellet durch vorsichtiges Absaugen des Überstandes getrocknet. Das getrocknete Pellet wurde umgehend bei -80°C bis zur weiteren Verarbeitung eingefroren.

4.3. Aufarbeitung der Proben

- 0,4 N Schwefelsäure:
 - 536 μ l >95 % Schwefelsäure
 - in 50 mL H₂O
- 100 % Trichloressigsäure (TCA):
 - 10 g TCA (Fluka)
 - auf 10 mL mit H₂O aufgefüllt
- 80 % Aceton (-20°C):
 - 32 mL Aceton
 - und 18 mL H₂O
- Pellet resolve Buffer (HTCD-Puffer):
 - 7 M Harnstoff, Roth
 - 2 M Thioharnstoff, Fluka
 - 2 % Chaps, Roth
 - 75 mM DTT, Fluka
- Hier verwendetes H₂O:
 - Aqua ad injectabile, Braun
- Für die folgenden Aufarbeitungsschritte wurden ausschließlich Eppendorf LoBind Tubes und Filterpipettenspitzen verwendet, die frei von DNA, DNase, RNAse und PCR-Inhibitoren waren.

4.3.1. Histonextraktion aus gefrorenen Zellpellets

Die getrockneten und bei -80°C eingefrorenen Zellpellets wurden noch gefroren zweimal mit 0,5 mL 0,4 N Schwefelsäure resuspendiert und dann in ein 2 mL Eppendorf LoBinding Tube überführt. Um eine gleichmäßige Zellsuspension zu erhalten wurden die Tubes kurz gevortext. Unter Rotation in einem Überkopfrüttler wurden die Histone danach für 60 Minuten bei 4°C extrahiert. Nach Zentrifugation für

20 Minuten bei 4°C und 13200 rpm wurde der Überstand in ein 1,5 mL Eppendorf LoBinding Tube überführt. Das Sediment wurde verworfen.

4.3.2. TCA-Fällung von Proteinen

Die Proteinlösung wurde mit 100%iger TCA bis zu einer Endkonzentration von 20 % TCA versetzt und für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Die Pelletierung des Niederschlags erfolgte durch 10-minütige Zentrifugation bei 4°C und 13200 rpm. Der Überstand wurde verworfen und das gewonnene Pellet mit 500 µl -20°C kaltem 80%igem Aceton zweimal gewaschen, erneut pelletiert (10 Minuten, 4°C, 13200 rpm) und bei Raumtemperatur getrocknet. Nach der Trocknung wurde das Pellet in eine angepasste Menge HTCD-Puffer aufgenommen (10.000 Zellen/µl, bezogen auf die bei den Kulturflaschen bestimmte Zellzahl). Nach 30-minütigem Rütteln in einem Multivortexer wurden die Histonproben bis zum weiteren Gebrauch bei -20°C eingefroren.

4.4. Gelelektrophorese

4.4.1. Vorbereitung der Proben für die Gelelektrophorese

- NuPAGE LDS Sample Buffer (4x), Invitrogen
- NuPAGE Sample Reducing Agent (10x), Invitrogen
- 7 M Urea, Roth
- Proteinstandards:
 - Histone H3 human 500 ng/μl (Upstate)
 - Histone H4 drosophila 0,4 μg/μl (Dr. Imhof)
 - Histone H2B 50 ng/μl (Stressgen)
- Reagenz für Proteinstandard 1x:
 - 2,5 μL LDS Sample Buffer (4x)
 - 1,0 μL Sample Reducing Agent (10x)
 - 6,5 μL 7 M Urea
 - 0,2 μL Proteinstandard
- Reagenz für Probenansatz 1x (ausreichend für einen Slot):
 - 2,5 μL LDS Sample Buffer (4x)
 - 1,0 μL Sample Reducing Agent (10x)
 - 2,5 μL 7 M Urea
 - 4 μL Histonprobe

In der Regel wurden zwei Gele mit denselben Histonproben parallel gefahren, so dass der Probenansatz in 2,5x vorbereitet wurde. Zur Vereinfachung des Anmischens wurde aus dem LDS Sample Buffer und dem Sample Reducing Agent zuvor ein Master Mix (20x) angesetzt. Zur Denaturierung wurden die fertigen Proben in einem Thermostadt bei 70°C für 10 Minuten inkubi ert.

4.4.2. Durchführung der Gelelektrophorese

- Elektrophoresegerät: XCell SureLock Mini-Cell, Invitrogen
- Gelplatten: NuPage 12 % Bis-Tris Gel, 1,0 mm x 15well, Invitrogen
- Running Buffer: NuPage MES SDS Running Buffer (20x), Invitrogen
- Antioxidant: NuPage Antioxidant, Invitrogen
- Protein-Größenstandard: SeeBlue Plus2 Prestained Standard (1x), Invitrogen
- Aqua bidest, Serag Wiessner
- Ansatz für Verbrauchslösungen:
 - Running Buffer (1x):
 - 50 mL NuPage MES SDS Running Buffer (20x)
 - 950 mL Aqua bidest
 - Running Buffer + Antioxidant:
 - 200 mL Running Buffer (1x)
 - 50 μ L NuPage Antioxidant

Vor dem Einbau in die Elektrophoresekammer wurden die Kämme und Schlitzabdeckungen von den Gelen entfernt und die Slots mindestens dreimal mit einem alten Running Buffer (siehe unten) gespült. Danach erfolgte der Einbau der Gele in die Elektrophoresekammer nach Herstellerangaben. Vor der Bestückung der Slots mit den entsprechenden Proben wurden die einzelnen Slots zusätzlich mit Running Buffer + Antioxidant befüllt. Für die Proben wurde ein Auftragsvolumen von 10 μ L pro Slot gewählt, für den Protein-Größenstandard 5 μ L. Nach Bestückung der Slots mit den Proben wurde die innere Kammer des Elektrophoresegerätes mit 200 mL Running Buffer + Antioxidant, die äußere Kammer mit 600 mL Running Buffer (1x) befüllt.

Die Elektrophorese wurde bei maximal 250 mA durchgeführt. Als Laufbedingungen wurden für die ersten 10 Minuten 100 V gewählt, um ein möglichst gleichmäßiges Einlaufen der Proben in das Trenngel zu erzielen, für die restliche Zeit wurde auf 200 V erhöht. Die Laufzeit betrug im Allgemeinen etwa 60 Minuten. Anhand der vorgefärbten Banden des Protein-Größenstandards und der Farbstoffbanden des

4. Material und Methoden

LDS Sample Buffers wurde der Zeitpunkt, an dem die Größenaufftrennung der Proteinbanden ausreichend war, optisch kontrolliert und die Elektrophorese gestoppt.

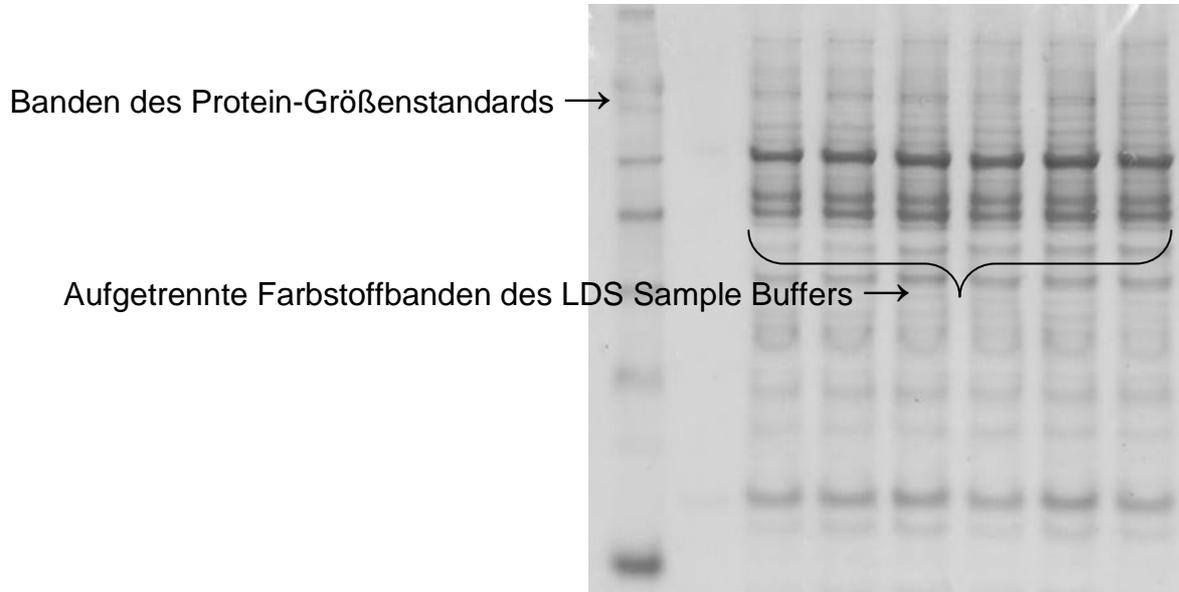


Abb. 5: Gel mit aufgetrennten Proteinbanden nach abgelaufener Gelelektrophorese

Nach der Gelelektrophorese wurde der Running Buffer aus der inneren und äußeren Kammer des Gerätes zur Wiederverwendung abgesaugt. Nach viermaliger Nutzung wurde der Running Buffer neu angesetzt, die alte Verbrauchslösung wurde zum Spülen der Gele verwendet (siehe oben).

4.5. Analyse der Histonmodifikationen mittels Western Blot

Um Proteine mit spezifischen Antikörpern zu detektieren, wurden sie nach der elektrophoretischen Auftrennung auf eine Nitrocellulose-Membran übertragen.

4.5.1. Durchführung des Western Blot

- Transfergerät:
 - XCell SureLock Mini-Cell, Invitrogen
 - XCell II Blot Module, Invitrogen
- Nitrocellulose-Membran:
 - Filter Paper Sandwich, 0,2 µm Pore Size, Invitrogen
- Transfer Buffer:
 - NuPage Transfer Buffer (20x), Invitrogen
- Methanol, Merck
- Ansatz für Verbrauchslösung:
 - Transfer Buffer (1x) für zwei Membranen:
 - 25 mL NuPage Transfer Buffer (20x)
 - 375 mL Aqua bidest
 - 100 mL Methanol
 - 500 µL NuPage Antioxidant

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die Gele aus der Kammer entnommen und aus ihrer Kunststoffhülle gelöst. Die Filter Paper Sandwiches und die zum Blot Module gehörigen Blottingschwämme wurden in Transfer Buffer (1x) getränkt und anschließend wie folgt ein Stapel zusammengebaut:

4. Material und Methoden

- Kathode
- Blottingschwamm
- Filterpapier
- Gel
- Filterpapier
- Blottingschwamm
- Filterpapier
- Gel
- Filterpapier
- 2x Blottingschwamm
- Anode

Mit Hilfe einer Pipette wurden zwischen den einzelnen Stapelschritten durch vorsichtiges Walzen die Luftblasen verdrängt. Danach wurde das fertig bestückte Blotting Module nach Herstellerangaben in das Transfergerät eingesetzt und mit Transfer Buffer (1x) befüllt, bis der Inhalt vollständig bedeckt war. Die äußere Kammer des Transfergerätes wurde zur Kühlung mit 650 mL Wasser befüllt.

Durch ein elektrisches Feld im Transfersystem erfolgte dann die Übertragung der Proteine auf die Membran. Die Transferbedingungen wurden auf 30 V, maximal 170 mA und 60 Minuten standardisiert.

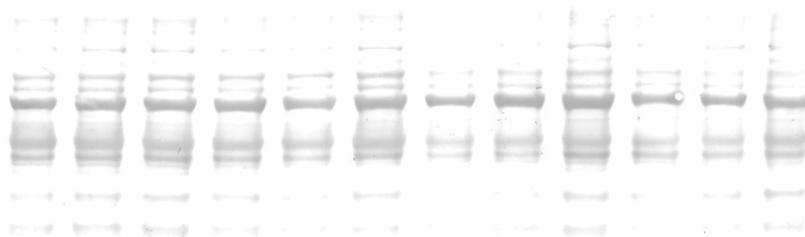


Abb. 6: Nitrocellulose-Membran mit übertragenen Proteinbanden

4.5.2. Coomassie-Färbung eines Proteingels

- Blue Silver: Coomassie-Färbelösung zusammengesetzt aus
 - 117,6 mL 85%ige Phosphorsäure
 - 100 g Ammoniumsulfat, Fluka
 - 1,2 g Coomassie G250
 - 200 mL Methanol
 - auf 1000 mL mit Aqua bidest aufgefüllt
- Entfärberlösung:
 - 10 % Glycerin, Roth
 - in Aqua bidest

Der Farbstoff Coomassie färbt Proteine unspezifisch blau an. Zur Kontrolle des Blottingvorgangs und Sichtbarmachung der nach dem Blotten auf dem Gel verbliebenen Proteine, wurden die Gele nach dem Western Blot mit einer Coomassie-Färbelösung angefärbt.

Die Gele wurden über Nacht in Blue Silver gefärbt und anschließend in Entfärberlösung bei Raumtemperatur zwei Tage inkubiert, bis der Hintergrund entfärbt und die Proteinbanden gut zu erkennen waren. Die Entfärberlösung wurde hierbei nach einem Tag erneuert. Zur Archivierung wurden die Gele auf einem Trocknungsrahmen zwischen zwei Zellophanblättern mindestens zwei Tage bei Raumtemperatur getrocknet.

4.5.3. Detektion eines Western Blots

- Roti-Block, 10x Konzentrat, Roth
- PBS (10x) = Phosphate-Buffered Saline: pH 7,4
 - 0,72 g Kaliumhydrogencarbonat
 - 2,58 g Kaliumphosphat, dibasisch, wasserfrei, Fluka
 - 45 g NaCl
 - in 500 mL Aqua bidest

- Tween 20, Sigma
- Visualizer Western Blot Detection Kit, rabbit, Upstate
- Prospekthüllen: aus PP-Material, glasklar
- Ansatz für Verbrauchslösungen:
 - Blocking Reagent (1x):
 - 1 mL Roti-Block (10x)
 - 9 mL Aqua bidest
 - Wash-Buffer (1x PBS mit 0,1 % Tween 20):
 - 15 mL PBS (10x)
 - 135 mL Aqua bidest
 - 150 μ L Tween 20

Primäre Antikörper:

- Anti-Histone-H3, rabbit polyclonal, 200 μ g/mL (Santa Cruz)
- Anti-Histone-H4, rabbit polyclonal (Upstate)
- Anti-acetyl-Histone H3, rabbit polyclonal IgG (Upstate)
- Anti-acetyl-Histone H4, rabbit antiserum (Upstate)
- Anti-phospho-Histone H2B (Ser14), rabbit antiserum (Upstate)
- Anti-phospho-Histone H3 (Ser10), clone MC463, rabbit monoclonal IgG (Upstate)
- Anti-trimethyl-Histone H3 (Lys9), rabbit antiserum (Upstate)
- Anti-beta-Actin, rabbit (Rockland)

Sekundärer Antikörper:

- Goat Anti-Rabbit IgG, HRP-conjugate 1 mg/mL

Nach Beendigung des Blottingvorgangs wurden die Nitrocellulosemembranen zunächst zweimal für 5 Minuten unter leichtem Schwenken bei Raumtemperatur in Aqua bidest gewaschen. Um unspezifische Proteinbindungsstellen abzusättigen wurden die Membranen dann für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter leichtem

4. Material und Methoden

Schwenken und danach über nacht bei 4°C in Ruhe mit Blocking Reagent (1x) inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Membranen vor der Antikörper-Inkubation nochmals etwa 30 Minuten bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken im Blocking Reagent (1x) weiterinkubiert und danach wie folgt zurechtgeschnitten:

Die für unsere Arbeit interessanten Histone liegen nach der elektrophoretischen Auftrennung zwischen 10 und 20 kDa (H4 bei ~10 kDa, H2B bei ~15 kDa, H3 bei ~17 kDa). Die Beladungskontrolle durch Anti- β -Actin stellt sich bei etwa 42 kDa dar. Daraus folgend wurden die Membranen jeweils zwischen den durch den Protein-Größenstandard angefärbten Banden für 28 und 38 kDa durchgeschnitten.

Die Inkubation mit dem primären Antikörper erfolgte über 60 Minuten bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken. Die Verdünnung war antikörperspezifisch und erfolgte in Blocking Reagent (1x). Für die Inkubation einer halben Membran wurden jeweils 7,5 mL Blocking Reagent (1x) mit dem primären Antikörper angesetzt.

Anschließend wurden die Membranen dreimal für 5 Minuten bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken mit Wash Buffer gewaschen.

Danach erfolgte über weitere 60 Minuten bei Raumtemperatur die Inkubation mit dem sekundären Antikörper unter leichtem Schwenken. Pro halbe Membran wurden 10 mL Blocking Reagent (1x) mit 0,25 μ L sekundärem Antikörper versetzt.

Nach der Inkubation mit dem sekundären Antikörper wurden die Membranen bei Raumtemperatur auf dem Schwenktisch wie folgt gewaschen:

3 mal 5 Minuten in Wash Buffer.

3 mal 5 Minuten in Aqua bidest.

Die Detektion wurde mittels Chemilumineszenz durchgeführt. Die Herstellung der Visualizer working Solution erfolgte nach Herstellerangaben. Pro halbe Membran wurden 1050 μ L benötigt. Die Membranen wurden mit einer Pinzette aus dem Aqua bidest entnommen, kurz über ein saugfähiges Tuch abgetropft und auf eine Folie

gelegt. Mit Hilfe einer Pipette wurde die Visualizer working Solution luftblasenfrei auf die Membranen geträufelt. Nach einer Inkubationszeit von 5 Minuten wurden die Membranen wiederum über ein Tuch abgetropft und für den anschließenden Entwicklungsvorgang in Prospekthüllen abgedunkelt aufbewahrt.

4.5.4. Filmentwicklung

- Bio Max light Film, Kodak
- GBX developer and fixer, Sigma
- Destilliertes Wasser

Die Expositionszeit des Röntgenfilms auf den durch Chemilumineszenz fluoreszierenden Membranen betrug zwischen 1 und 5 Sekunden. Die anschließende Entwicklung der Röntgenbilder wurde nach Herstellerangaben durchgeführt.

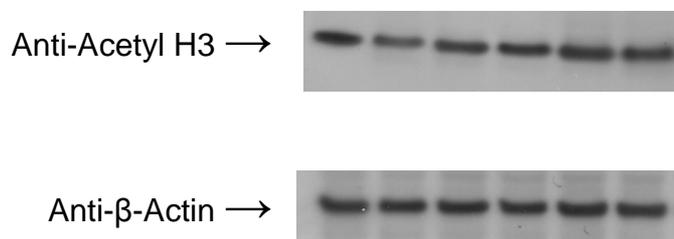


Abb. 7: Entwickelte Röntgenbilder von detektierten Western Blots

4.5.5. Amidoschwarz-Färbung einer Membran

- Amidoschwarz: 0,1 %
- Entfärberlösung:
 - 10 % Isopropanol
 - 10 % Essigsäure, Merck
 - in Aqua bidest

Amidoschwarz färbt Proteine unspezifisch blau an. Zur Sichtbarmachung der Proteine auf den Membranen wurden diese nach der Detektion und Filmentwicklung in Amidoschwarz angefärbt und danach etwa 2-3 mal mit Entfärberlösung behandelt, bis der Hintergrund entfärbt und die Proteinbanden gut zu erkennen waren.

4.5.6. Stripping und Reprobing

- Stripping Buffer = Acid Glycine Stripping Buffer: pH 2,2
 - 7,5 g Glycine
 - 0,5 g SDS
 - 5 mL Tween 20
 - in 250 mL Aqua bidest

Um einen Western Blot nacheinander mit verschiedenen Antikörpern detektieren zu können, wurde nach der Detektion mittels Chemilumineszenz versucht, die entsprechenden Antikörper durch Stripping von der Membran zu entfernen.

Es wurden verschiedene Methoden zum Stripping durchgeführt, die im Folgenden beschrieben werden:

1.)

- Membran 2mal für 30 Minuten in Stripping Buffer inkubieren.
- Membran 3mal für 5 Minuten mit PBS (1x) waschen.
- Inkubation und Waschschrirte jeweils bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken.

2.)

- Membran 2mal für 30 Minuten in Stripping Buffer mit 1M DTT bei 42°C inkubieren.
- Membran 3mal für 5 Minuten mit PBS (1x) bei Raumtemperatur waschen.
- Inkubation und Waschschrirte jeweils unter leichtem Schwenken.

3.)

- Membran für 15 Minuten in Stripping Buffer inkubieren.
- Membran 2mal für 15 Minuten in Stripping Buffer mit 1 % SDS inkubieren.
- Membran 3mal für 5 Minuten mit Wash Buffer waschen.
- Inkubation und Waschschrirte jeweils bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken.

4.)

- Membran für 15 Minuten in Stripping Buffer inkubieren.
- Membran 2mal für 15 Minuten in Stripping Buffer mit 2 % SDS inkubieren.
- Membran 3mal für 5 Minuten mit Wash Buffer waschen.
- Inkubation und Waschschrirte jeweils bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken.

5.)

- Membran 3mal für 15 Minuten in Stripping Buffer mit 2 % SDS bei 42°C inkubieren.
- Membran 3mal für 5 Minuten mit Wash Buffer bei Raumtemperatur waschen.
- Inkubation und Waschschrirte jeweils unter leichtem Schwenken.

Zur Absättigung der unspezifischen Proteinbindungsstellen wurden die Membranen nach dem Stripping für 30 Minuten bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken und danach über nacht bei 4°C in Ruhe mit Blocking Reagent (1x) inkubiert. Am folgenden Tag wurden die Membranen vor dem Reprobing nochmals etwa 30 Minuten bei Raumtemperatur unter leichtem Schwenken im Blocking Reagent (1x) weiterinkubiert.

Um festzustellen, ob durch das Stripping alle Antikörper von der Membran entfernt worden sind, wurde das folgende Reprobing zunächst als Strippingkontrolle durchgeführt. Hierfür wurde die Inkubation der Membran mit einem neuen primären Antikörper übersprungen, und es erfolgte lediglich eine Inkubation mit dem

4. Material und Methoden

sekundären Antikörper (60 Minuten, bei Raumtemperatur, unter leichtem Schwenken) und die Waschschrirte in Wash Buffer und Aqua bidest (jeweils 3mal 5 Minuten, bei Raumtemperatur, unter leichtem Schwenken).

Die anschließende Detektion mittels Chemilumineszenz und Filmentwicklung zeigte, dass es mit allen von uns durchgeführten Methoden des Stripping nicht möglich war, die „alten“ Antikörper vollständig von der Membran zu entfernen. Auf dem entwickelten Film hätten sich theoretisch keine Banden mehr darstellen dürfen. In diesem Fall wäre das Stripping erfolgreich gewesen und die Membran hätte für eine weitere Detektion mit anderen Antikörpern herangezogen werden können. Es zeigte sich jedoch ein lediglich leicht abgeschwächtes Bild der vorherigen Detektion, womit festgestellt wurde, dass die von uns durchgeführten Strippingmethoden nicht zum Ziel führten.

Weitere Änderungen am Versuchsaufbau wurden nicht durchgeführt.

4.6. Auswertung und statistische Analyse

Die angefärbten und getrockneten Gelplatten und Nitrocellulose Membranen sowie die belichteten Röntgenbilder wurden zur Archivierung und Auswertung eingescannt.

4.6.1. Auswertung der Röntgenbilder

Die sich auf den entwickelten Röntgenbildern darstellenden Banden entsprachen jeweils derjenigen Histonmodifikation, mit deren Antikörper die Membran zuvor inkubiert wurde. Anhand der Dichte der Banden ließen sich Rückschlüsse auf den Grad dieser Histonmodifikation schließen.

Um objektive Ergebnisse zu erhalten, wurde die Dichte der Banden an den eingescannten Röntgenbildern mit Hilfe eines Computerprogramms (ImageJ 1.34s, National Institutes of Health, USA) bestimmt.

Da ein Unterschied in der Bandendichte nicht nur durch den Grad der Histonmodifikation, sondern auch durch Unregelmäßigkeiten in der Beladung der einzelnen Gelslots verursacht worden sein kann, wurde bei der Bestimmung der Bandendichte eine Beladungskontrolle mit einbezogen. Die über die Beladungskontrolle normierten Daten ergaben sich aus dem Quotient zwischen Rohdaten und Beladungskontrolle. Zu Anfang wurde für die Beladungskontrolle die Dichte einer beliebigen Bande auf den angefärbten Membranen bestimmt. Im weiteren Verlauf der Versuche wurde dazu übergegangen, eine zusätzliche Detektion mit einem Anti- β -Actin Antikörper durchzuführen.

4.6.2. Statistische Analyse

Die statistische Analyse der Daten wurde mit Hilfe eines Computers durchgeführt. Die densitometrischen Originaldaten wurden aufgrund ihrer Verteilung logarithmisch transformiert. Entsprechend wurden die deskriptiven Kenngrößen in Form des geometrischen Mittelwertes und des geometrischen Standardfehlers (Standardabweichung des Mittelwertes) angegeben. Letzterer ist als ein dimensionsloser Faktor zu interpretieren, mit dem der geometrische Mittelwert multipliziert bzw. durch den er dividiert werden muss, um das Intervall zu erhalten, in dem die um maximal eine Standardabweichung vom Mittelwert abweichenden Daten liegen. Die Berechnung der geometrischen Mittelwerte und Standardfehler erfolgte nach logarithmischer Transformation der Originaldaten in EXCEL mittels der dort vorhandenen Funktionen, und die so erhaltenen Kenngrößen wurden mittels der Potenzfunktion in den Originalbereich zurücktransformiert, um die Interpretation zu erleichtern.

Um die möglicherweise unterschiedliche Beladung der Gele in Rechnung zu stellen, wurden die densitometrischen Daten der Immunfärbung individuelle für jedes Gel auf die densitometrischen Daten der Amidoschwarz-Proteinfärbung bzw. der β -Aktin-Bande bezogen, die für dieses Gel erhalten wurden. Dies entsprach im Bereich der Originaldaten einer Division der densitometrischen Daten durch den Bezugswert, im logarithmischen Bereich entsprechend einer Subtraktion. In den Graphiken sind ebenfalls die geometrischen Mittelwerte sowie die nach Multiplikation mit dem geometrischen Standardfehler erreichten Obergrenzen des 1-Sigma-Bereichs angegeben.

Alle statistischen Vergleiche erfolgten mit den logarithmierten Daten, um den Voraussetzungen einer parametrischen Varianzanalyse möglichst weitgehend zu genügen. Die parametrische Analyse logarithmierter Daten wurde statt einer nichtparametrischen unlogarithmierter Daten gewählt, um bei der vergleichsweise kleinen Fallzahl ($n=7$) pro analysiertem Marker mit möglichst hoher Teststärke zu statistisch tragfähigen und gerechtfertigten Aussagen zu gelangen. Verwendet wurde zur Analyse jeweils ein repeated-measures-Design mit *post hoc*-Vergleichen nach

4. Material und Methoden

Newman-Keuls. Zur Darstellung gewählt wurde für einen gegebenen Teilvergleich der maximale Signifikanzlevel, bei dem dieser Vergleich stabil blieb, ansonsten der Signifikanzlevel mit maximaler Auflösung zwischen den einzelnen Behandlungen. Zusätzlich wurden der t-Test sowie der nichtparametrische Test nach Mann-Whitney für einzelne Vergleiche eingesetzt. Statistische Signifikanz wurde wie üblich bei einer Irrtumswahrscheinlichkeit (Fehler erster Art, α) von $< 0,05$ angenommen.

5. Ergebnisse

5.1. Ergebnisse der Western Blots

Da mit der EPLC-Zelllinie sowohl eine Expositionsreihe mit $n=7$ für die Agenzien Natriumbutyrat und Cisplatin, als auch eine Expositionsreihe mit $n=7$ für die Agenzien Sirtinol und Cisplatin durchgeführt wurde, konnten die Ergebnisse bezüglich der Kontrolle und Cisplatin als $n=14$ zusammengefasst werden. Diese Daten werden im Folgenden zuerst dargestellt, um abzuklären, ob und inwieweit Cisplatin überhaupt zu einer Veränderung der kovalenten Histonmodifikationen führte, die sodann mittels der Inhibitoren der Histon-Deacetylasen modifiziert werden sollten. Darüber hinaus ging die zusammenfassende Analyse der Daten, die nach vergleichbarem Protokoll mit Natriumbutyrat und Sirtinol erhalten wurden, aufgrund der höheren Fallzahl mit einer höheren Teststärke (Power) als die einzelnen Versuchsreihen einher. Wesentliche Ergebnisse dieser Arbeit wurden auf der Tagung der European Respiratory Society 2007 vorgestellt [Jörres *et al.*, 2007].

Im Folgenden sind die Einzelwerte in logarithmischer Skala sowie die geometrischen Mittelwerte und Standardfehler der untersuchten Histonmodifikationen für die Kontrolle und Cisplatinexposition der EPLC-Zelllinie aufgetragen ($n=14$).

5.1.1. EPLC-Zellen, Kontrolle und Cisplatin (n=14)

Abb. 8a: Gesamt-Acetylierung H3 (EPLC, n=14)

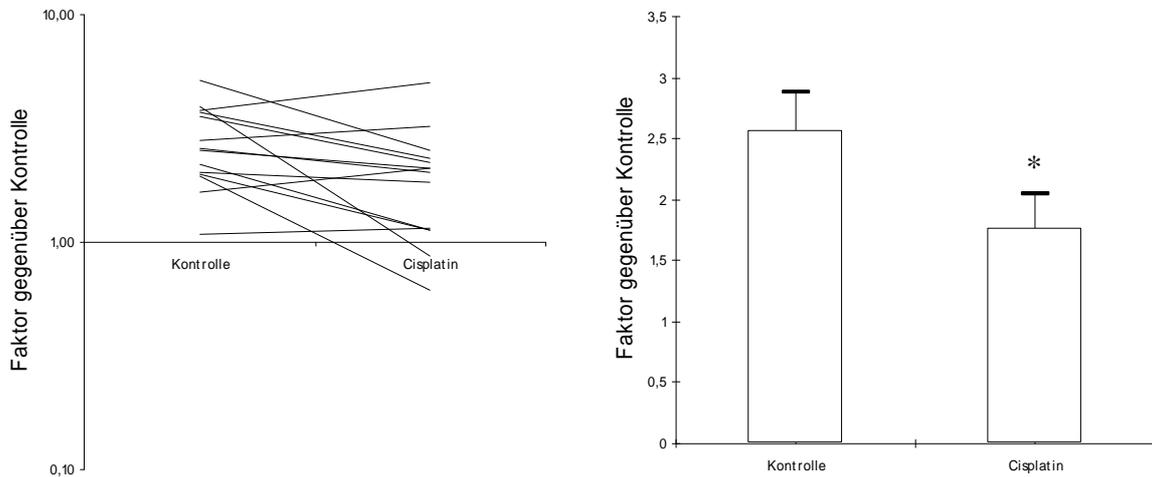


Abb. 8a: Die Inkubation mit Cisplatin führte im Vergleich zur Kontrolle zu einer reduzierten Gesamt-Acetylierung von H3 mit statistischer Signifikanz (*; $p < 0,05$; t-Test).

Abb. 8b: Gesamt-Acetylierung H4 (EPLC, n=14)

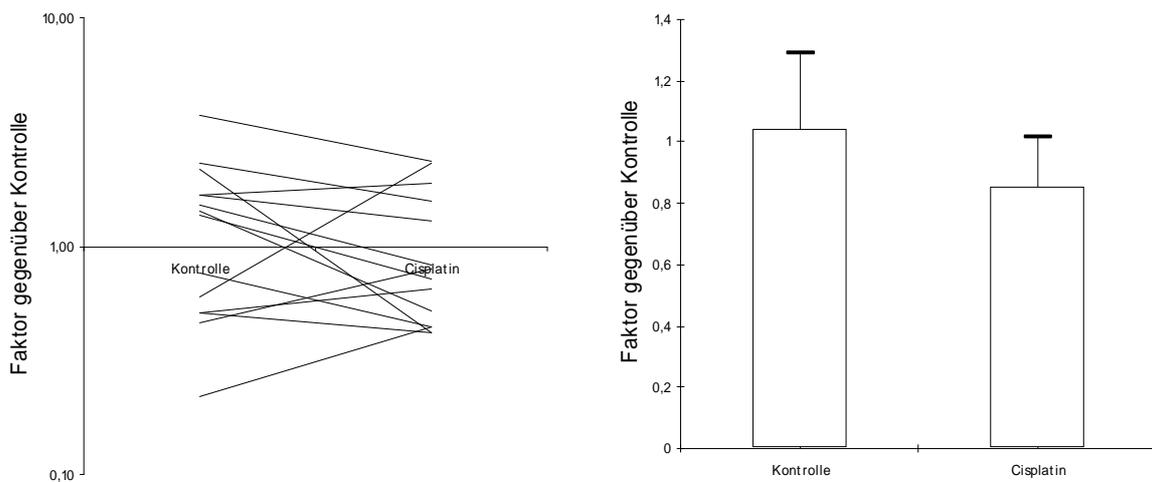


Abb. 8b: Auf die Gesamt-Acetylierung von H4 zeigte die Exposition mit Cisplatin einen reduzierenden Effekt, jedoch ohne statistische Signifikanz ($p > 0,05$; t-Test).

Abb. 8c: Phosphorylierung H2B Ser14 (EPLC, n=14)

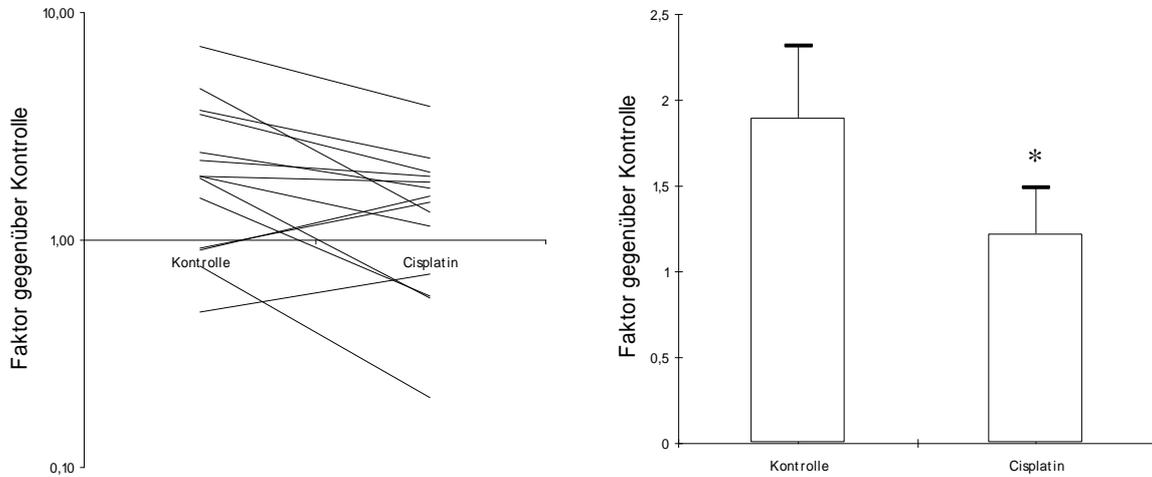


Abb. 8c: Durch die Inkubation mit Cisplatin wurde die Phosphorylierung von H2B Ser14 im Vergleich zur Kontrolle statistisch signifikant abgeschwächt (*; $p < 0,05$; t-Test).

Abb. 8d: Phosphorylierung H3 Ser10 (EPLC, n=14)

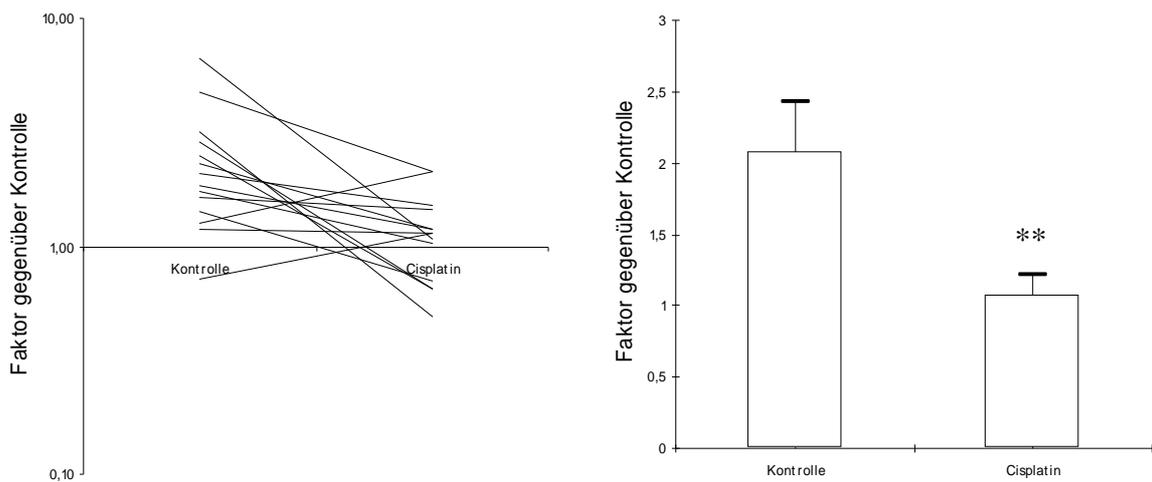


Abb. 8d: Nach Gabe von Cisplatin war die Phosphorylierung von H3 Ser10 im Vergleich zur Kontrolle mit statistischer Signifikanz reduziert (**; $p < 0,01$; t-Test).

Abb. 8e: Trimethylierung H3 Lys9 (EPLC, n=14)

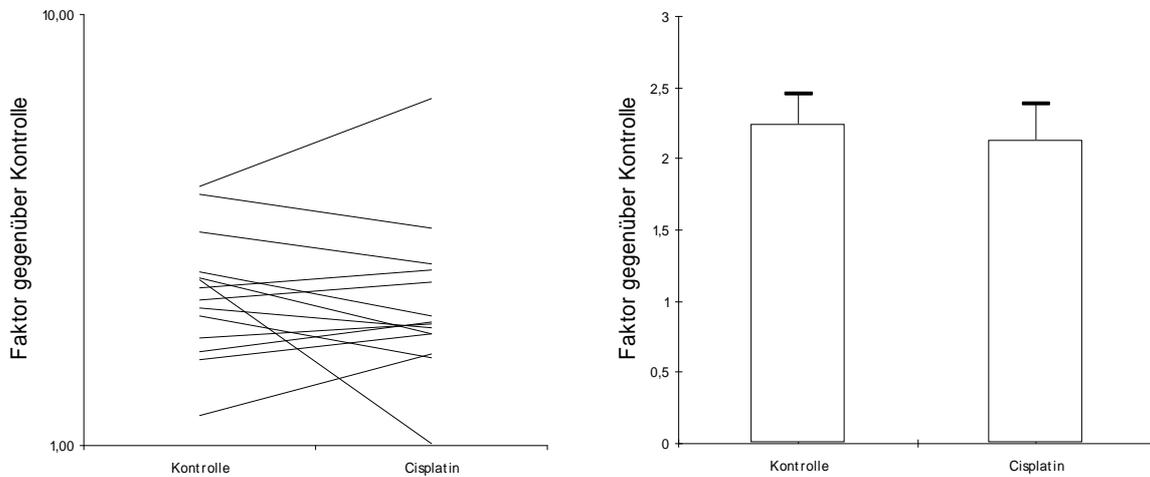


Abb. 8e: Bei Exposition mit Cisplatin wurde verglichen mit der Kontrolle keine statistisch signifikante Auswirkung auf die Trimethylierung von H3 Lys9 erreicht ($p > 0,05$; t-Test).

In Tabelle 5 sind die geometrischen Mittelwerte und geometrischen Standardfehler der untersuchten Histonmodifikationen für $n=14$ nach Inkubation der EPLC-Zelllinie mit Cisplatin im Vergleich mit der Kontrolle zusammenfassend in numerischer Form angegeben.

5. Ergebnisse

	Geometrischer Mittelwert	Geometrischer Standardfehler
	Gesamt-Acetylierung H3	
Kontrolle	2,57	1,12
Cis	1,76*	1,16
	Gesamt-Acetylierung H4	
Kontrolle	1,04	1,23
Cis	0,85	1,19
	Phosphorylierung H2B Ser14	
Kontrolle	1,90	1,22
Cis	0,32*	1,22
	Phosphorylierung H3 Ser10	
Kontrolle	2,08	1,17
Cis	1,08**	1,12
	Trimethylierung H3 Lys9	
Kontrolle	2,25	1,09
Cis	2,13	1,12

Tab. 5: Geometrische Mittelwerte und Standardfehler der untersuchten Histonmodifikationen bei Inkubation der EPLC-Zelllinie mit Cisplatin (n=14)

Auf den nachfolgenden Seiten sind die Histonmodifikationen der untersuchten Zelllinien (EPLC, Beas-2B, HCC) unter den verschiedenen Expositionsbedingungen dargestellt (jeweils n=7). Gezeigt sind jeweils der geometrische Mittelwert und der geometrische Standardfehler der über die Beladungskontrolle normierten Daten.

5.1.2. EPLC-Zellen, Cisplatin und Natriumbutyrat

Abb. 9a: Gesamt-Acetylierung H3 (EPLC-NaBu)

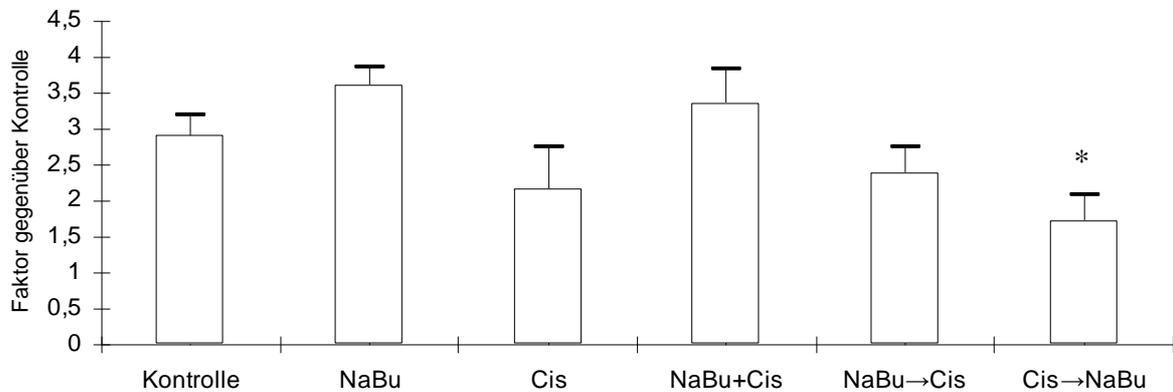


Abb. 9a: Bei aufeinander folgender Inkubation mit zuerst Cis, gefolgt von NaBu, war die Gesamt-Acetylierung von H3 im Vergleich zu NaBu alleine oder der gleichzeitigen Gabe von NaBu und Cis reduziert (*; $p < 0,05$). Cis alleine hatte im Vergleich zur Kontrolle keinen signifikanten Effekt (Newman-Keuls-Test).

Abb. 9b: Gesamt-Acetylierung H4 (EPLC-NaBu)

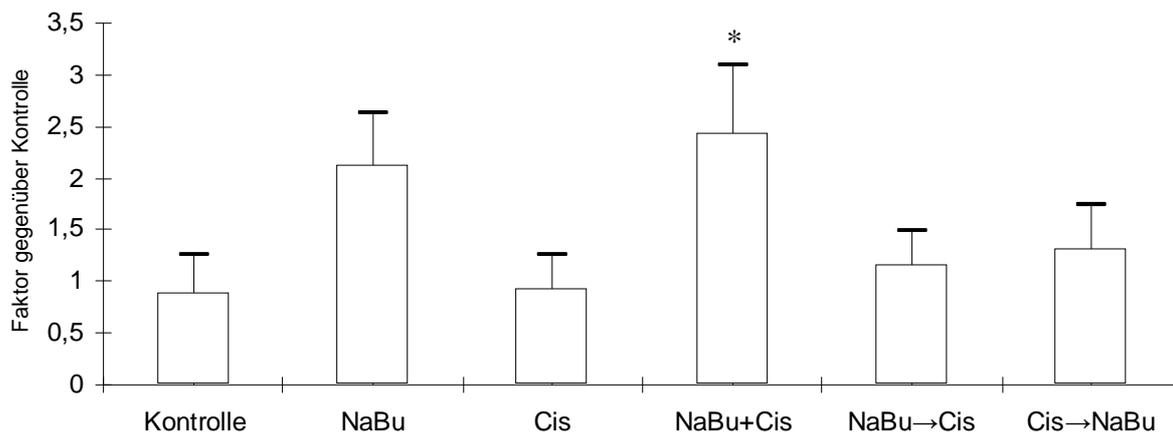


Abb. 9b: Die gleichzeitige Inkubation mit NaBu und Cis führte zu einer verstärkten Acetylierung von H4, die stärker war als für die Kontrolle oder für die alleinige Gabe von Cis (*; $p < 0,05$). NaBu alleine hatte auf die Gesamt-Acetylierung von H4 verglichen mit der Kontrolle keinen signifikanten Effekt (Newman-Keuls-Test).

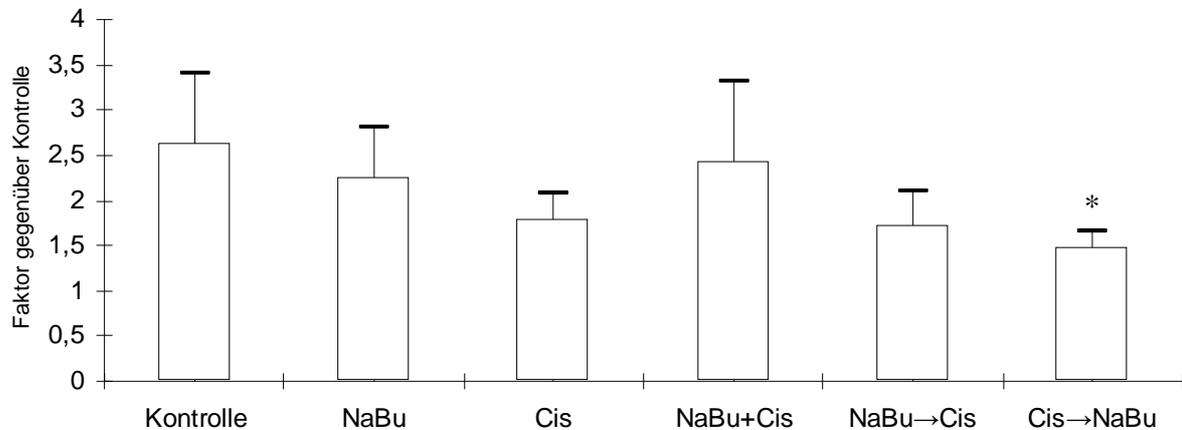
Abb. 9c: Phosphorylierung H2B Ser14 (EPLC-NaBu)

Abb. 9c: Durch die aufeinander folgende Gabe von Cis gefolgt von NaBu war die Phosphorylierung von H2B Ser14 am stärksten reduziert, allerdings war der Unterschied nur im Vergleich zur Kontrolle signifikant (*; $p < 0,05$). Durch die anderen Inkubationen wurde kein signifikanter Effekt verglichen mit der Kontrolle erreicht (Newman-Keuls-Test).

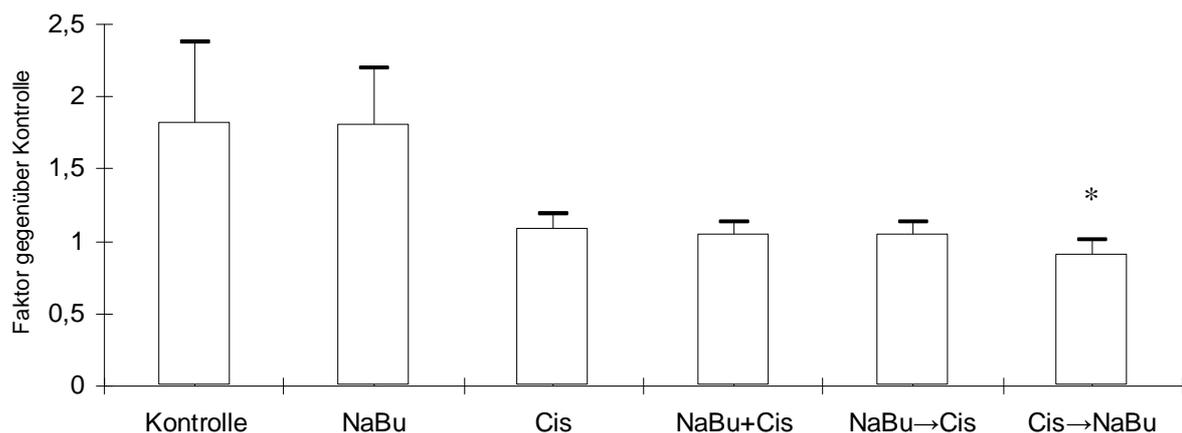
Abb. 9d: Phosphorylierung H3 Ser10 (EPLC-NaBu)

Abb. 9d: Bei aufeinander folgender Inkubation mit Cis und NaBu war die Phosphorylierung von H3 Ser10 im Vergleich zur Kontrolle oder NaBu alleine reduziert (*; $p < 0,05$). Cis alleine zeigte gegenüber der Kontrolle keinen signifikanten Effekt (Newman-Keuls-Test).

Abb. 9e: Trimethylierung H3Lys9 (EPLC-NaBu)

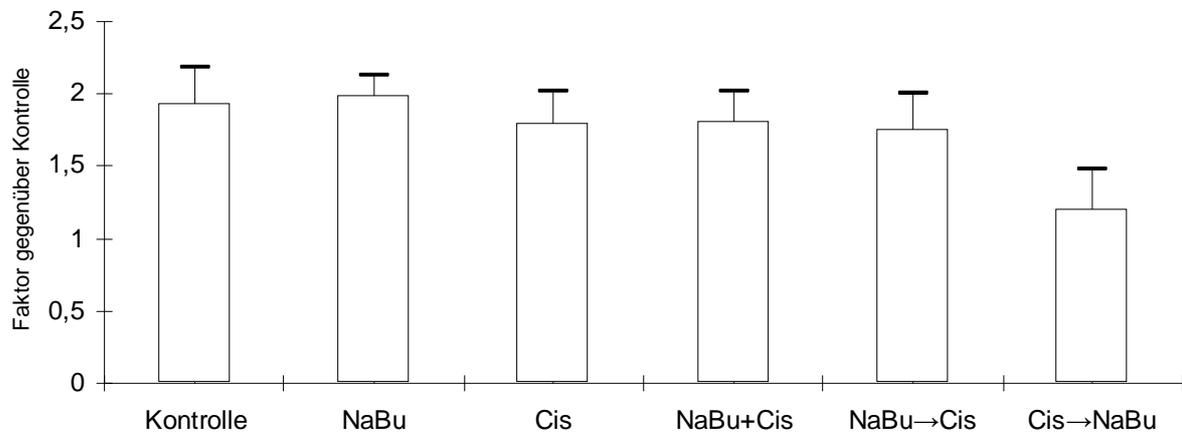


Abb. 9e: Bei Exposition mit Cis gefolgt von NaBu zeigte sich eine reduzierte Trimethylierung von H3 Lys9 gegenüber der Kontrolle. Diese und alle anderen Inkubationen hatten jedoch verglichen mit der Kontrolle keine statistisch signifikante Auswirkung auf die Trimethylierung ($p > 0,05$; Newman-Keuls-Test).

In Tabelle 6 sind die geometrischen Mittelwerte und geometrischen Standardfehler der untersuchten Histonmodifikationen nach Inkubation der EPLC-Zelllinie mit Cisplatin und Natriumbutyrat zusammenfassend in numerischer Form angegeben.

5. Ergebnisse

	Geometrischer Mittelwert	Geometrischer Standardfehler
Gesamt-Acetylierung H3		
Kontrolle	2,91	1,10
NaBu	3,61	1,07
Cis	2,17	1,27
NaBu + Cis	3,36	1,14
NaBu → Cis	2,40	1,15
Cis → NaBu	1,73*	1,21
Gesamt-Acetylierung H4		
Kontrolle	0,89	1,41
NaBu	2,12	1,24
Cis	0,93	1,36
NaBu + Cis	2,44*	1,27
NaBu → Cis	1,16	1,29
Cis → NaBu	1,32	1,32
Phosphorylierung H2B Ser14		
Kontrolle	2,64	1,29
NaBu	2,25	1,25
Cis	1,79	1,16
NaBu + Cis	2,44	1,35
NaBu → Cis	1,73	1,21
Cis → NaBu	1,48*	1,12
Phosphorylierung H3 Ser10		
Kontrolle	1,82	1,30
NaBu	1,80	1,22
Cis	1,09	1,09
NaBu + Cis	1,05	1,08
NaBu → Cis	1,05	1,08
Cis → NaBu	0,91*	1,11
Trimethylierung H3 Lys9		
Kontrolle	1,94	1,13
NaBu	1,98	1,07
Cis	1,79	1,13
NaBu + Cis	1,80	1,12
NaBu → Cis	1,75	1,14
Cis → NaBu	1,21	1,23

Tab. 6: Geometrische Mittelwerte und Standardfehler der untersuchten Histonmodifikationen bei Inkubation der EPLC-Zelllinie mit Cisplatin und/oder Natriumbutytrat

5.1.3. EPLC-Zellen, Cisplatin und Sirtinol

Abb. 10a: Gesamt-Acetylierung H3 (EPLC-Sirtinol)

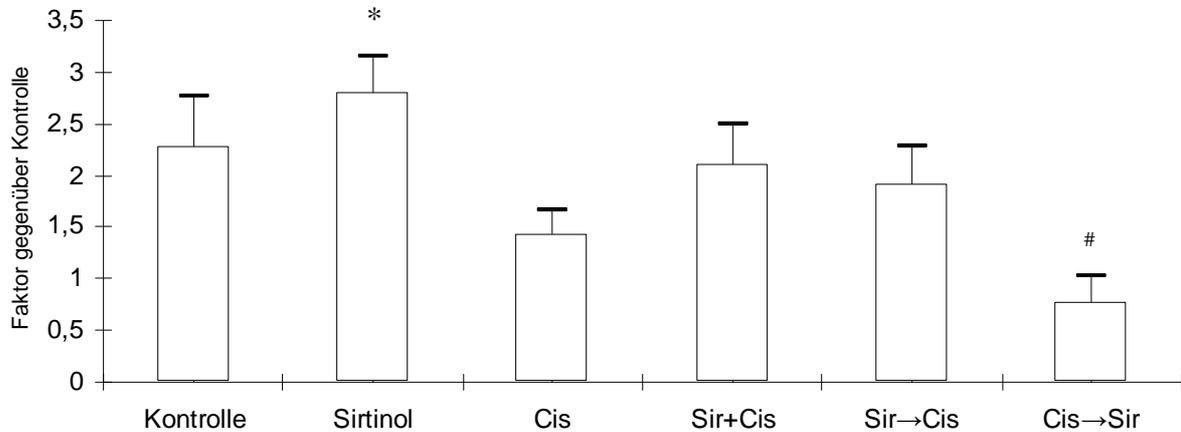


Abb. 10a: Sir alleine führte im Vergleich zu Cis alleine oder der aufeinander folgenden Inkubation mit zuerst Cis, dann Sir zu einer verstärkten Gesamt-Acetylierung von H3 (*; $p < 0,05$). Bei aufeinander folgender Inkubation mit Cis und Sir zeigte sich im Vergleich zu allen anderen Expositionen die geringste Gesamt-Acetylierung von H3 (#; $p < 0,05$). Die Exposition mit Cis alleine wies gegenüber Sir alleine und Inkubation mit Cis gefolgt von Sir, jedoch nicht gegenüber der Kontrolle statistische Signifikanz auf (Newman-Keuls-Test).

Abb. 10b: Gesamt-Acetylierung H4 (EPLC-Sirtinol)

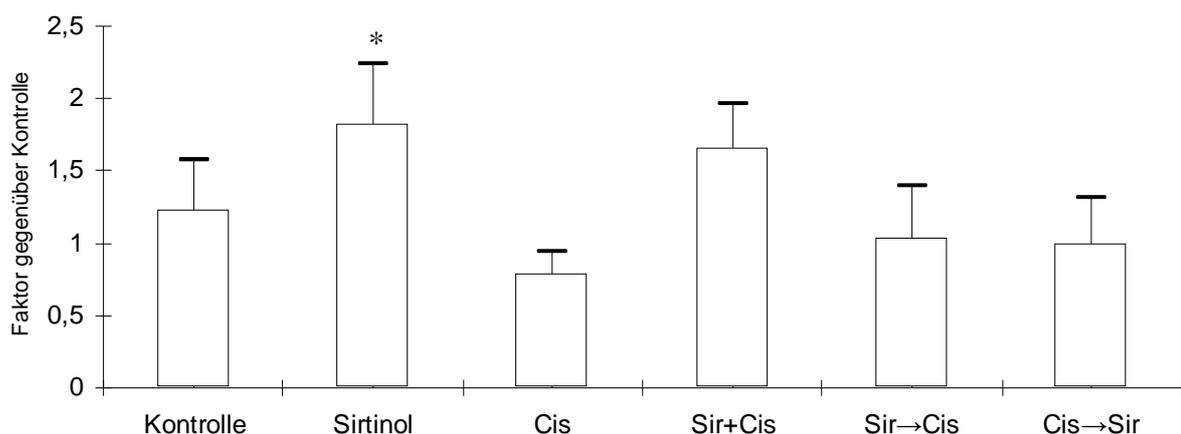


Abb. 10b: Nach Inkubation mit Sir alleine war die Acetylierung von H4 am stärksten, allerdings war der Unterschied nur im Vergleich zu Cis alleine signifikant (*; $p < 0,05$). Alle anderen Vergleiche zwischen den Expositionen ergaben keine statistisch signifikanten Unterschiede (Newman-Keuls-Test).

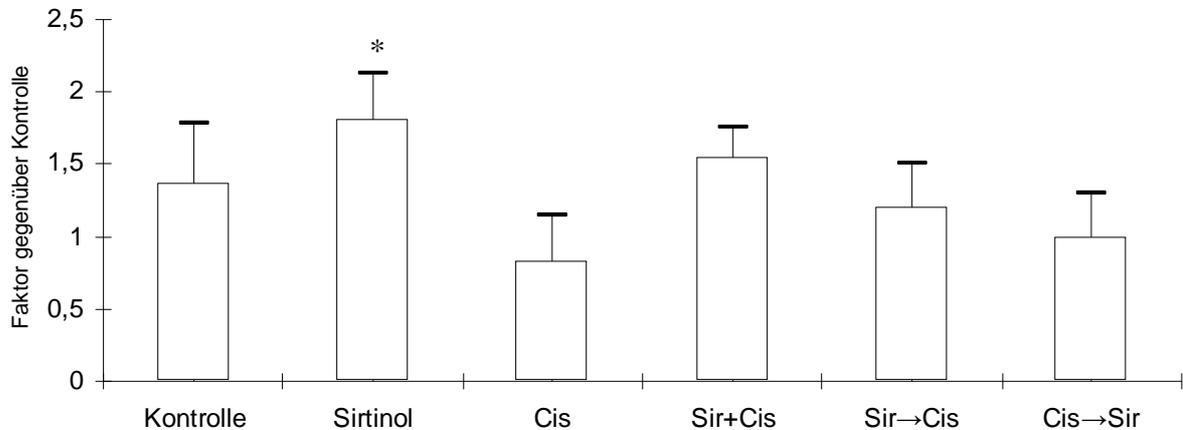
Abb. 10c: Phosphorylierung H2B Ser14 (EPLC-Sirtinol)

Abb. 10c: Bei alleiniger Gabe von Sir war die Phosphorylierung von H2B Ser14 am stärksten, statistisch signifikant war hierbei aber nur der Unterschied zu Cis alleine (*; $p < 0,05$). Alle anderen Expositionen zeigten im Vergleich keine statistische Signifikanz (Newman-Keuls-Test).

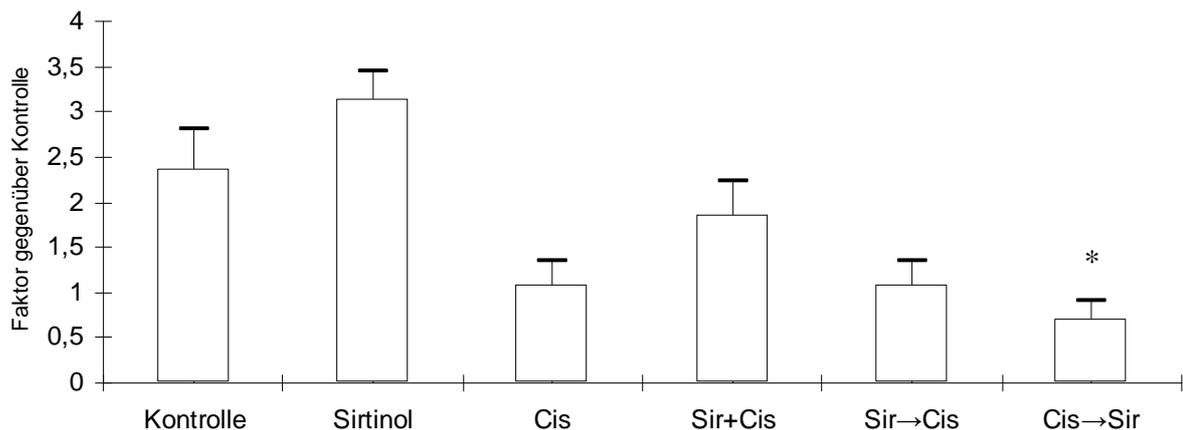
Abb. 10d: Phosphorylierung H3 Ser10 (EPLC-Sirtinol)

Abb. 10d: Durch Inkubation mit Cis gefolgt von Sir zeigte sich im Vergleich zur Kontrolle und Sir als alleiniges Agens die geringste Phosphorylierung von H3 Ser10 (*; $p < 0,05$). Cis alleine hatte im Vergleich mit der Kontrolle keinen signifikanten Effekt (Newman-Keuls-Test).

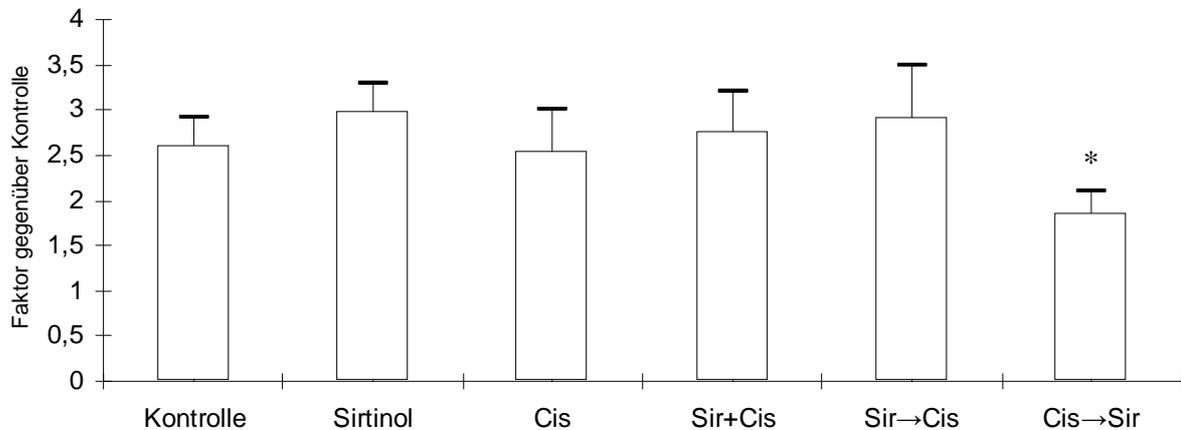
Abb. 10e: Trimethylierung H3 Lys9 (EPLC-Sirtinol)

Abb. 10e: Die Inkubation mit Cis gefolgt von Sir ergab im Vergleich zu allen anderen Expositionen die geringste Trimethylierung von H3 Lys9 (*; $p < 0,05$). Alle anderen Vergleiche zwischen den Expositionen ergaben keine statistisch signifikanten Unterschiede (Newman-Keuls-Test).

In Tabelle 7 sind die geometrischen Mittelwerte und geometrischen Standardfehler der untersuchten Histonmodifikationen nach Inkubation der EPLC-Zelllinie mit Cisplatin und Sirtinol zusammenfassend in numerischer Form angegeben.

5. Ergebnisse

	Geometrischer Mittelwert	Geometrischer Standardfehler
Gesamt-Acetylierung H3		
Kontrolle	2,27	1,22
Sir	2,80*	1,13
Cis	1,43	1,16
Sir + Cis	2,12	1,18
Sir → Cis	1,91	1,19
Cis → Sir	0,77 [#]	1,33
Gesamt-Acetylierung H4		
Kontrolle	1,23	1,28
Sir	1,82*	1,23
Cis	0,78	1,19
Sir + Cis	1,65	1,19
Sir → Cis	1,03	1,35
Cis → Sir	0,99	1,32
Phosphorylierung H2B Ser14		
Kontrolle	1,36	1,31
Sir	1,80*	1,18
Cis	0,83	1,38
Sir + Cis	1,54	1,14
Sir → Cis	1,21	1,25
Cis → Sir	1,00	1,30
Phosphorylierung H3 Ser10		
Kontrolle	2,37	1,18
Sir	3,14	1,10
Cis	1,07	1,25
Sir + Cis	1,86	1,20
Sir → Cis	1,08	1,25
Cis → Sir	0,70*	1,31
Trimethylierung H3 Lys9		
Kontrolle	2,60	1,12
Sir	2,97	1,11
Cis	2,54	1,19
Sir + Cis	2,76	1,16
Sir → Cis	2,92	1,20
Cis → Sir	1,86*	1,13

Tab. 7: Geometrische Mittelwerte und Standardfehler der untersuchten Histonmodifikationen bei Inkubation der EPLC-Zelllinie mit Cisplatin und/oder Sirtinol

5.1.4. Beas-2B-Zellen, Cisplatin und Natriumbutyrat

Abb. 11a: Gesamt-Acetylierung H3 (Beas-2B)

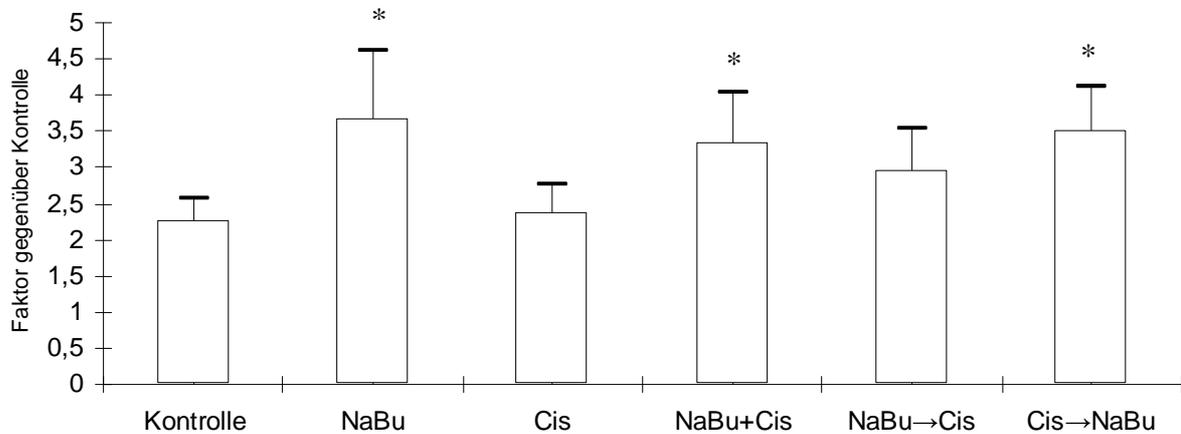


Abb. 11a: Im Vergleich zur Kontrolle oder Cis alleine war die Gesamt-Acetylierung von H3 bei NaBu alleine, der gleichzeitigen Inkubation mit Cis oder der aufeinanderfolgenden Gabe mit NaBu als zweites Agens verstärkt (*; $p < 0,05$; Newman-Keuls-Test).

Abb. 11b: Gesamt-Acetylierung H4 (Beas-2B)

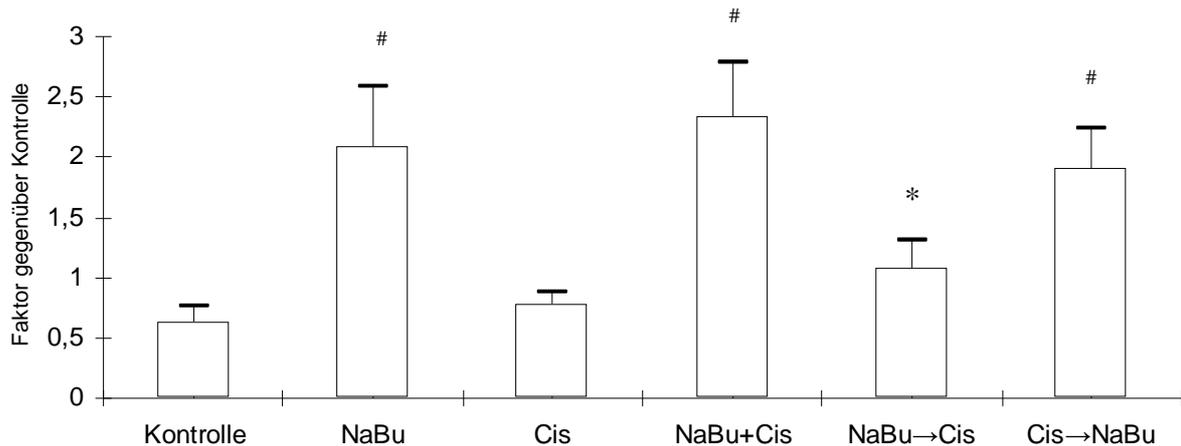


Abb. 11b: Durch NaBu gefolgt von Cis war die Acetylierung von H4 im Vergleich zur Kontrolle verstärkt (*; $p < 0,05$), jedoch nicht so stark, wie bei NaBu alleine, der gleichzeitigen Inkubation oder NaBu als zweitem Agens (#; $p < 0,05$). Cis alleine war im Vergleich zur Kontrolle nicht statistisch signifikant (Newman-Keuls-Test).

Abb. 11c: Phosphorylierung H2B Ser14 (Beas-2B)

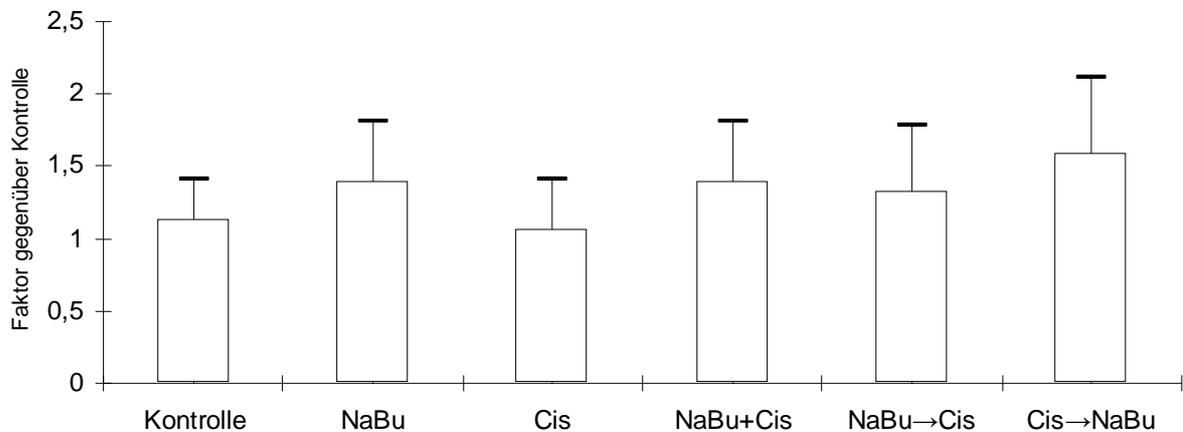


Abb. 11c: NaBu und seine Kombinationen führten zu einem moderaten Anstieg der Phosphorylierung von H2B Ser14. Eine statistische Signifikanz gegenüber der Kontrolle ergab sich jedoch in keinem Fall, insbesondere nicht für Cis ($p > 0,05$; Newman-Keuls-Test).

Abb. 11d: Phosphorylierung H3 Ser10 (Beas-2B)

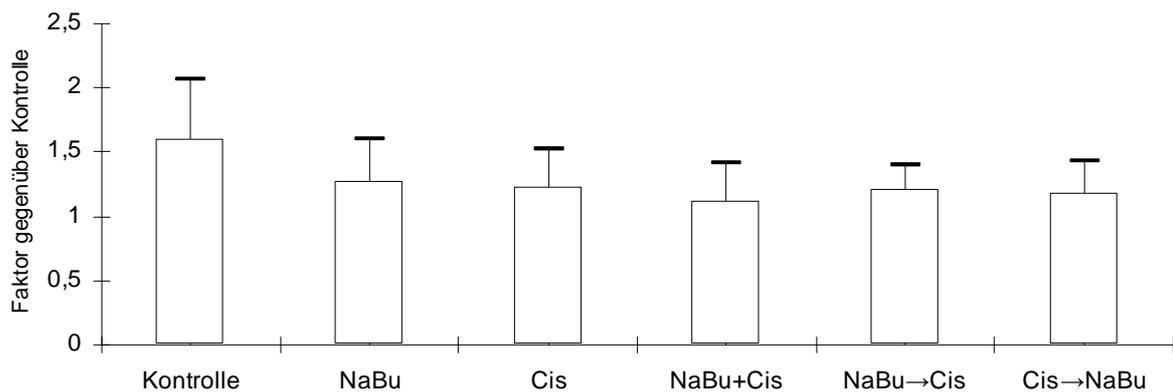


Abb. 11d: Die Einzelgabe der Komponenten sowie die verschiedenen Kombinationen führten zu einer geringfügigen Abnahme der Phosphorylierung von H3 Ser10. Keine der Expositionen ergab allerdings eine statistische Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle ($p > 0,05$; Newman-Keuls-Test).

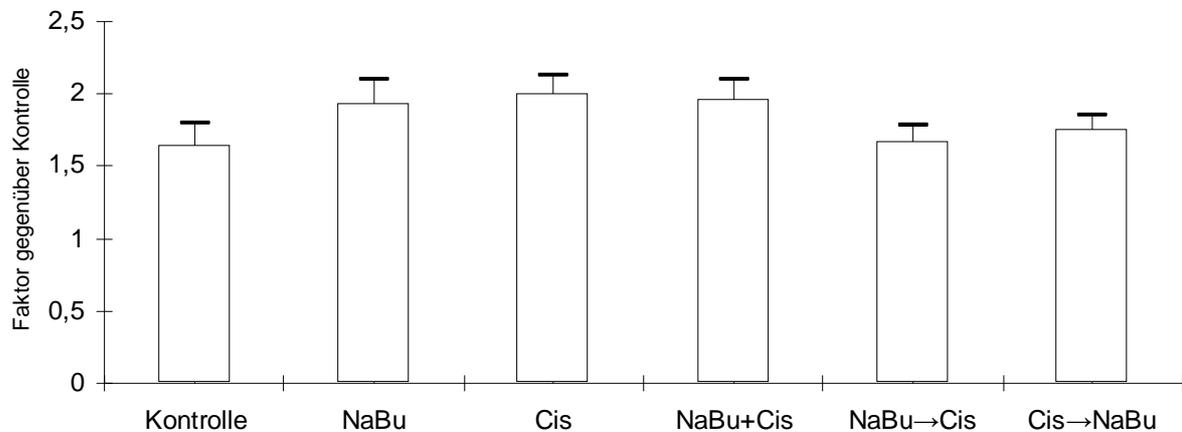
Abb. 11e: Trimethylierung H3 Lys9 (Beas-2B)

Abb. 11e: Die Exposition gegenüber NaBu und Cis alleine oder gleichzeitig führte zu einem leichtgradigen Anstieg der Trimethylierung. Eine statistische Signifikanz im Vergleich zur Kontrolle konnte jedoch bei keiner Exposition nachgewiesen werden ($p > 0,05$; Newman-Keuls-Test).

In Tabelle 8 sind die geometrischen Mittelwerte und geometrischen Standardfehler der untersuchten Histonmodifikationen nach Inkubation der Beas-2B-Zelllinie mit Cisplatin und Natriumbutyrat zusammenfassend in numerischer Form angegeben.

5. Ergebnisse

	Geometrischer Mittelwert	Geometrischer Standardfehler
Gesamt-Acetylierung H3		
Kontrolle	2,27	1,14
NaBu	3,68*	1,26
Cis	2,38	1,16
NaBu + Cis	3,34*	1,21
NaBu → Cis	2,96	1,19
Cis → NaBu	3,52*	1,17
Gesamt-Acetylierung H4		
Kontrolle	0,64	1,20
NaBu	2,08 [#]	1,24
Cis	0,78	1,13
NaBu + Cis	2,34 [#]	1,19
NaBu → Cis	1,08*	1,21
Cis → NaBu	1,91 [#]	1,17
Phosphorylierung H2B Ser14		
Kontrolle	1,14	1,24
NaBu	1,40	1,29
Cis	1,06	1,33
NaBu + Cis	1,39	1,30
NaBu → Cis	1,33	1,34
Cis → NaBu	1,59	1,32
Phosphorylierung H3 Ser10		
Kontrolle	1,60	1,30
NaBu	1,28	1,25
Cis	1,22	1,24
NaBu + Cis	1,12	1,26
NaBu → Cis	1,21	1,16
Cis → NaBu	1,18	1,21
Trimethylierung H3 Lys9		
Kontrolle	1,64	1,09
NaBu	1,93	1,09
Cis	2,00	1,07
NaBu + Cis	1,96	1,08
NaBu → Cis	1,67	1,07
Cis → NaBu	1,76	1,06

Tab. 8: Geometrische Mittelwerte und Standardfehler der untersuchten Histonmodifikationen bei Inkubation der Beas-2B-Zelllinie mit Cisplatin und/oder Natriumbutytrat

5.1.5. HCC-Zellen, Cisplatin und Natriumbutyrat

Abb. 12a: Gesamt-Acetylierung H3 (HCC)

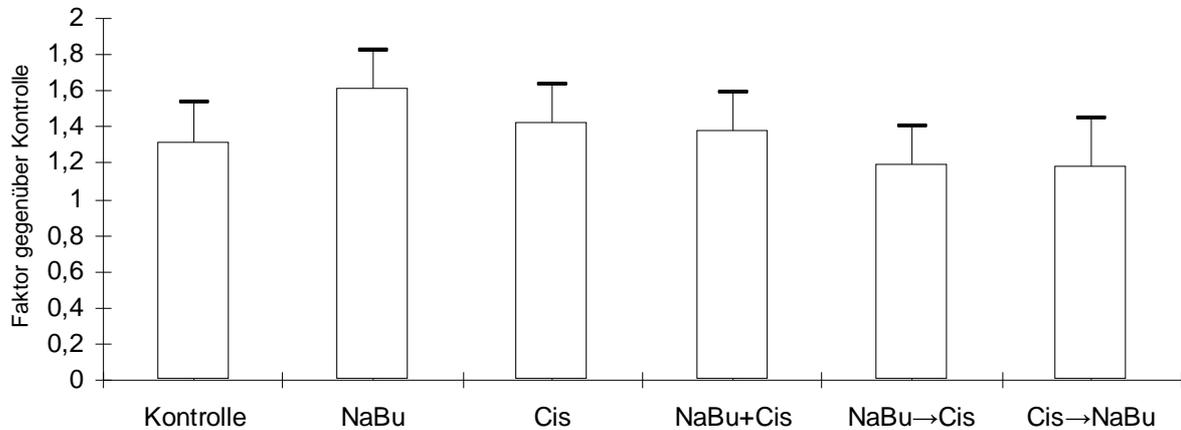


Abb. 12a: Durch NaBu alleine ergab sich ein moderater Anstieg der Gesamt-Acetylierung von H3. Sowohl diese als auch alle anderen Inkubationen zeigten jedoch keine statistisch signifikanten Veränderungen auf die Gesamt-Acetylierung von H3 beim Vergleich untereinander oder mit der Kontrolle ($p > 0,05$; Newman-Keuls-Test).

Abb. 12b: Gesamt-Acetylierung H4 (HCC)

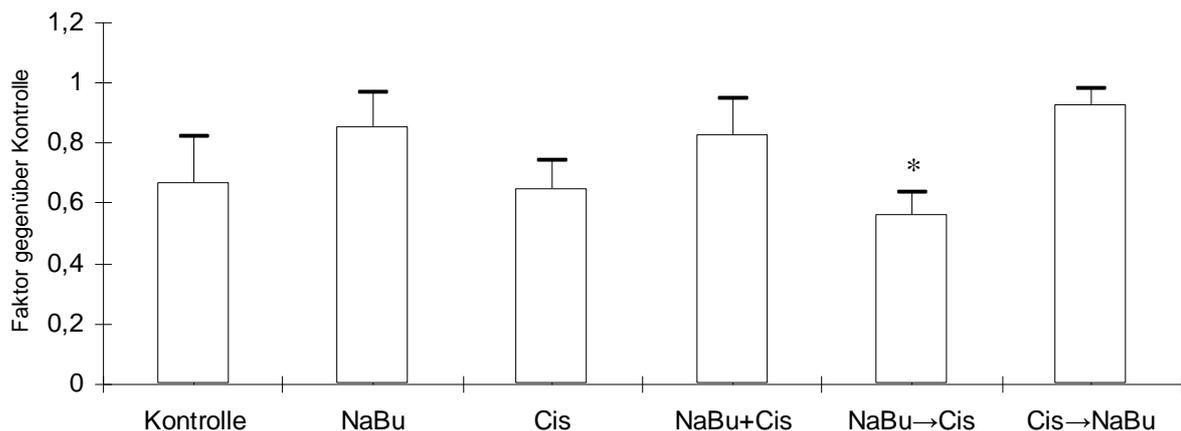


Abb. 12b: Bei der aufeinander folgenden Inkubation mit NaBu als erstes und Cis als zweites Agens zeigte sich im Vergleich zur umgekehrten Reihenfolge die geringste Gesamt-Acetylierung von H4 (*; $p < 0,05$). Durch Cis oder NaBu alleine wurde verglichen mit der Kontrolle kein statistisch signifikanter Effekt erreicht (Newman-Keuls-Test).

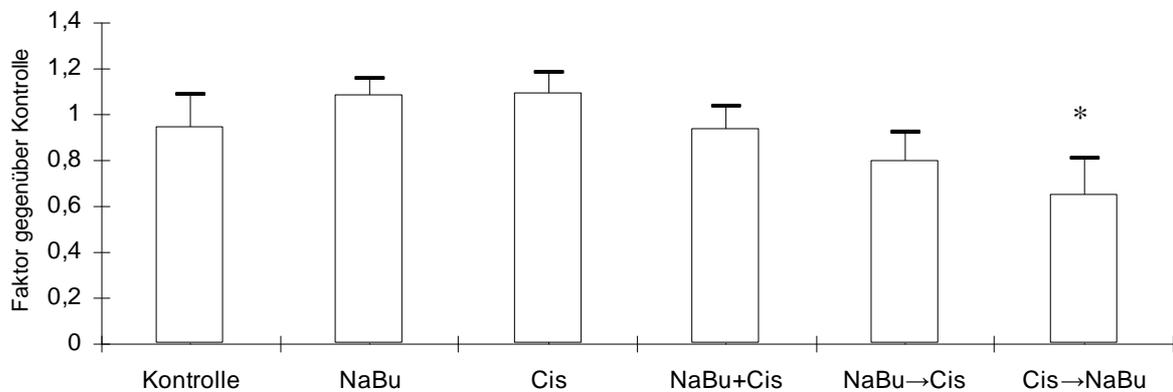
Abb. 12c: Phosphorylierung H2B Ser14 (HCC)

Abb. 12c: Cis gefolgt von NaBu zeigte im Vergleich zur Kontrolle, zu NaBu bzw. Cis alleine sowie der gleichzeitigen Inkubation eine verminderte Phosphorylierung von H2B Ser14 (*; $p < 0,05$). Die alleinigen Expositionen mit NaBu oder Cis ergaben im Vergleich zur Kontrolle keine statistische Signifikanz (Newman-Keuls-Test).

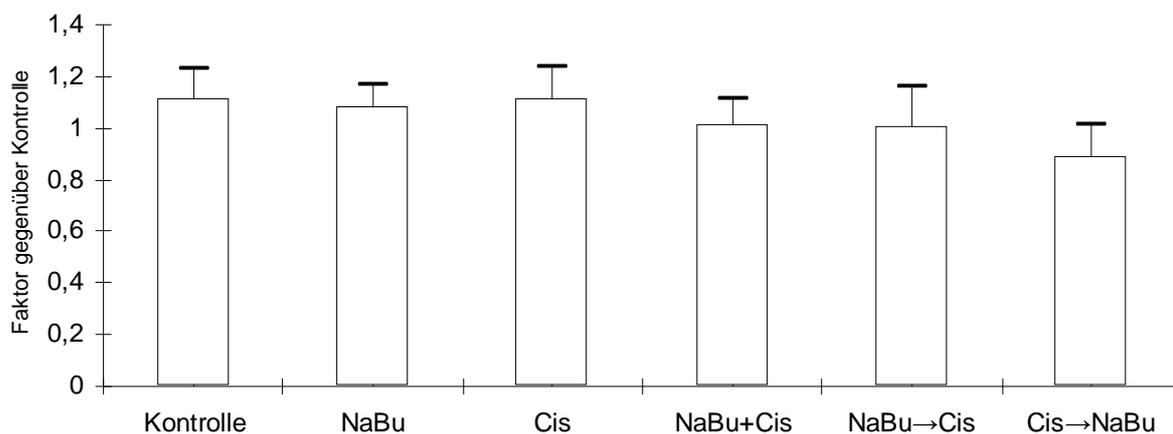
Abb. 12d: Phosphorylierung H3 Ser10 (HCC)

Abb. 12d: Die Phosphorylierung von H3 Ser10 erschien durch Cis gefolgt von NaBu gegenüber der Kontrolle reduziert. Für diese und die anderen der durchgeführten Inkubationen ergab sich allerdings keine statistische Signifikanz ($p > 0,05$; Newman-Keuls-Test).

Abb. 12e: Trimethylierung H3 Lys9 (HCC)

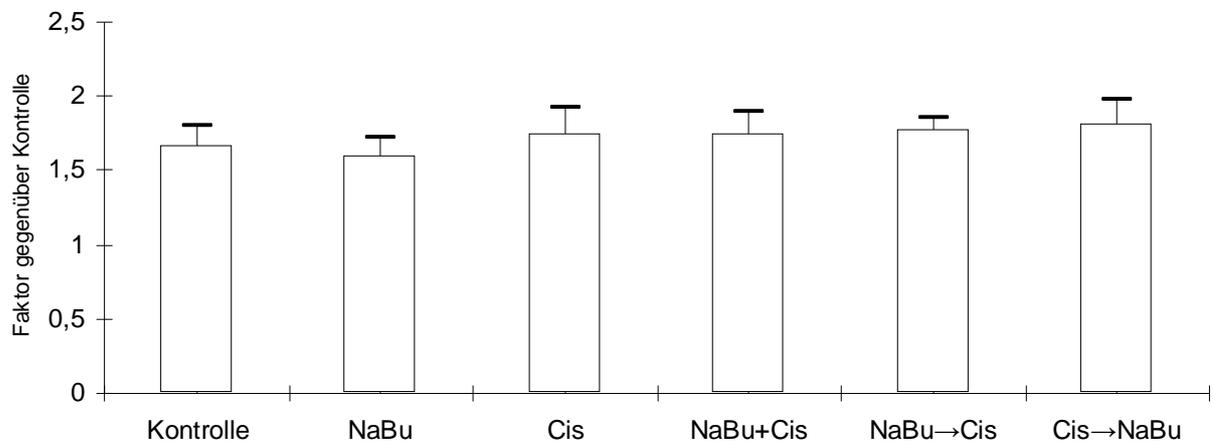


Abb. 12e: Bezüglich der Trimethylierung von H3 Lys9 konnten keine statistisch signifikanten Veränderungen nach den verschiedenen Expositionen nachgewiesen werden ($p > 0,05$; Newman-Keuls-Test).

In Tabelle 9 sind die geometrischen Mittelwerte und geometrischen Standardfehler der untersuchten Histonmodifikationen nach Inkubation der HCC-Zelllinie mit Cisplatin und Natriumbutyrat zusammenfassend in numerischer Form angegeben.

5. Ergebnisse

	Geometrischer Mittelwert	Geometrischer Standardfehler
Gesamt-Acetylierung H3		
Kontrolle	1,32	1,16
NaBu	1,61	1,13
Cis	1,43	1,15
NaBu + Cis	1,38	1,15
NaBu → Cis	1,19	1,19
Cis → NaBu	1,18	1,23
Gesamt-Acetylierung H4		
Kontrolle	0,67	1,23
NaBu	0,85	1,14
Cis	0,65	1,14
NaBu + Cis	0,83	1,14
NaBu → Cis	0,56*	1,13
Cis → NaBu	0,93	1,06
Phosphorylierung H2B Ser14		
Kontrolle	0,95	1,15
NaBu	1,09	1,06
Cis	1,09	1,08
NaBu + Cis	0,94	1,10
NaBu → Cis	0,80	1,15
Cis → NaBu	0,65*	1,23
Phosphorylierung H3 Ser10		
Kontrolle	1,11	1,11
NaBu	1,08	1,08
Cis	1,11	1,12
NaBu + Cis	1,02	1,10
NaBu → Cis	1,01	1,15
Cis → NaBu	0,89	1,14
Trimethylierung H3 Lys9		
Kontrolle	1,67	1,08
NaBu	1,61	1,08
Cis	1,75	1,09
NaBu + Cis	1,75	1,08
NaBu → Cis	1,77	1,05
Cis → NaBu	1,81	1,09

Tab. 9: Geometrische Mittelwerte und Standardfehler der untersuchten Histonmodifikationen bei Inkubation der HCC-Zelllinie mit Cisplatin und/oder Natriumbutyrat

5.2. Zellzahl und Kulturverlauf

Im Folgenden sind die Ergebnisse der Zellzählung in Einzelwerten und als geometrischer Mittelwert für die untersuchten Zelllinien aufgetragen. Ein Teil der Daten der EPLC-Zelllinie (Kontrolle und Cisplatin) für die beiden Versuchsreihen (Natriumbutyrat und Sirtinol) wurden wiederum zusammengefasst und sind nachfolgend zuerst dargestellt (n=14).

5.2.1. EPLC-Zellen, Kontrolle und Cisplatin (n=14)

Abb. 13a: EPLC Zellzählung (n=14)

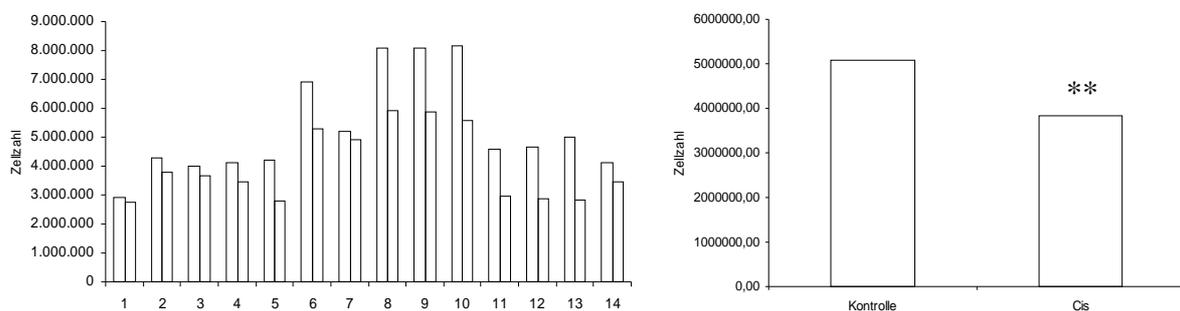


Abb. 13a: Die 14 Balkenpaare in der linken Graphik stehen für die 14 durchgeführten Zellpassagen, wobei die Paare 1-7 aus der Expositionsreihe mit Natriumbutyrat und die Paare 8-14 aus der Expositionsreihe mit Sirtinol stammen. Der jeweils erste der konsekutiven Balken eines Paares stellt die Kontrolle, der zweite jeweils die Exposition mit Cis dar.

Die Zellzahl wurde durch die Exposition mit Cis statistisch signifikant reduziert (**; $p < 0,01$; Newman-Keuls-Test). Die mittlere prozentuale Abnahme der Zellzahl unter Cis (geometrisches Mittel) lag bei 24,0 %. In der Versuchsreihe mit Sir (Reihe 8-14) zeigte sich im Mittel eine stärkere Reaktion ($p < 0,05$; Mann-Whitney U-Test) bezüglich der relativen Abnahme der Zellzahl als in der Versuchsreihen mit NaBu (Reihe 1-7).

5. Ergebnisse

In den Abbildungen 13b-13e stellen die 6 Balkenblöcke der jeweils linken Graphik die 6 unterschiedlichen Expositionen dar. Die 7 konsekutiven Balken jedes Balkenblocks stehen für die jeweils 7 durchgeführten Versuche, um die Streubreite der Antworten zu veranschaulichen. Die jeweils rechte Graphik der Abbildungen 13b-13e zeigen für die 6 unterschiedlichen Expositionen die geometrischen Mittelwerte der jeweils 7 Versuche.

5.2.2. EPLC-Zellen, Cisplatin und Natriumbutyrat

Abb. 13b: EPLC-NaBu Zellzählung

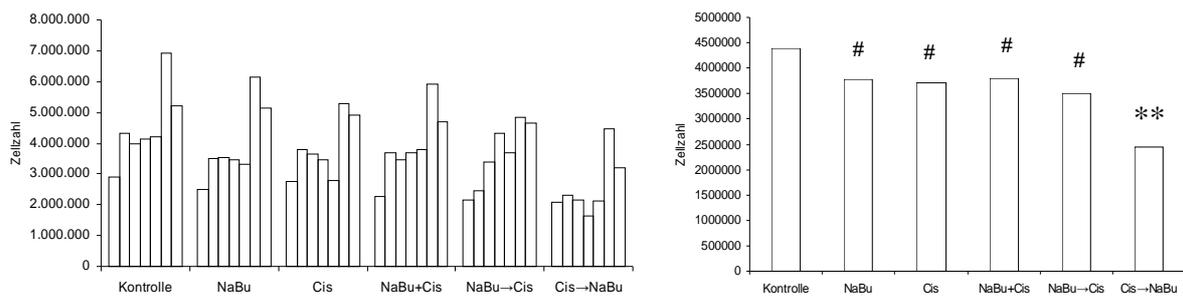


Abb. 13b: Bei allen durchgeführten Expositionen wurde die Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle jeweils statistisch signifikant reduziert (Newman-Keuls-Test). Dies war zum einen der Fall nach Gabe von NaBu, Cis, NaBu+Cis sowie NaBu gefolgt von Cis (#; $p < 0,05$ verglichen mit Kontrolle), welche keinen signifikanten Unterschied untereinander zeigten. Zum anderen war die Reduktion der Zellzahl durch Gabe von Cis gefolgt von NaBu am stärksten ausgeprägt und nicht nur im Vergleich zur Kontrolle, sondern auch zu allen anderen Expositionen statistisch signifikant (**; $p < 0,01$).

5.2.3. EPLC-Zellen, Cisplatin und Sirtinol

Abb. 13c: EPLC-Sirtinol Zellzählung

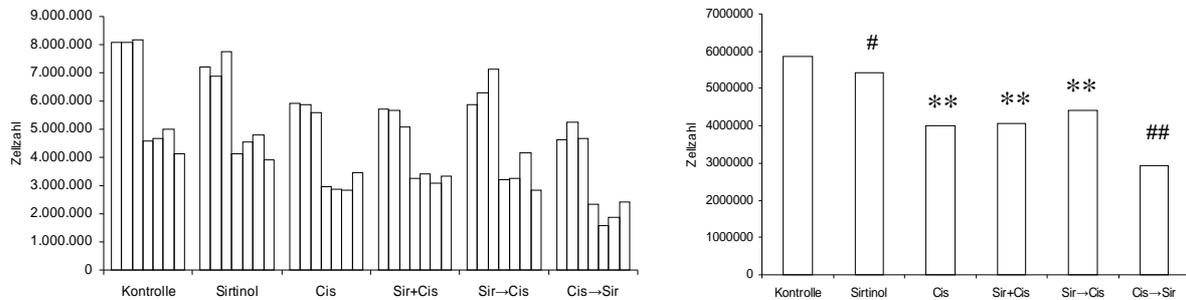


Abb. 13c: Eine statistische Signifikanz der Abnahme der Zellzahl gegenüber der Kontrolle ergab sich für alle Expositionen (Newman-Keuls-Test). Hierbei war der Effekt von Sir von dem Effekt aller anderen Expositionen verschieden; (# $p < 0,05$). Gleiches galt für Cis gefolgt von Sir (##; $p < 0,01$). Für Cis, Sir+Cis und Sir gefolgt von Cis ergaben sich signifikante Effekte im Vergleich zu den anderen Expositionen (**; $p < 0,01$), jedoch nicht im Vergleich zueinander.

5.2.4. Beas-2B-Zellen, Cisplatin und Natriumbutyrat

Abb. 13d: Beas-2B Zellzählung

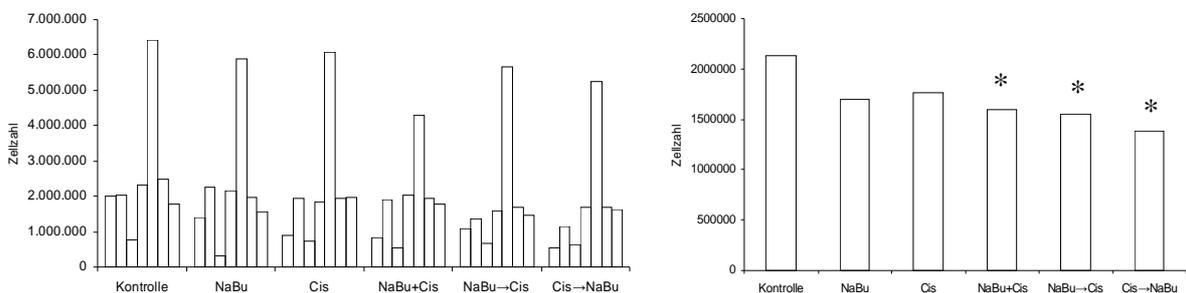


Abb. 13d: Die gleichzeitige sowie die beiden aufeinander folgenden Inkubationen mit NaBu und Cis führten zu einer statistisch signifikanten Verminderung der Zellzahl im Vergleich zur Kontrolle (*; $p < 0,05$). Hingegen zeigten die beiden anderen Expositionen keinen signifikanten Unterschied zur Kontrolle (Newman-Keuls-Test).

5.2.5. HCC-Zellen, Cisplatin und Natriumbutyrat

Abb. 13e: HCC Zellzählung

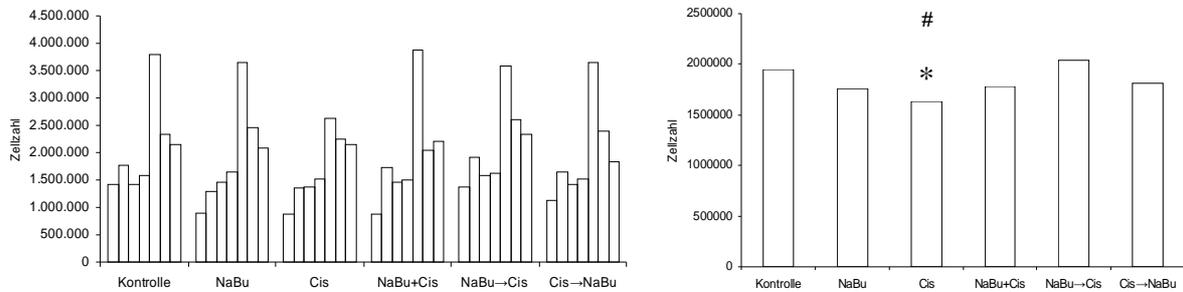


Abb. 13e: Durch sämtliche Inkubationen, außer der aufeinander folgenden Gabe von zuerst NaBu, dann Cis, ergab sich tendenziell eine Reduzierung der Zellzahl gegenüber der Kontrolle (Newman-Keuls-Test); allerdings wurde eine statistische Signifikanz nur durch Cis alleine erreicht (*; $p < 0,05$). Ferner war dieser Wert auch von dem Wert von NaBu gefolgt von Cis verschieden (#; $p < 0,05$).

5. Ergebnisse

In Tabelle 10 sind die geometrischen Mittelwerte der Zellzählung nach Inkubation der untersuchten Zelllinien mit Cisplatin und/oder Natriumbutyrat bzw. Sirtinol zusammenfassend in numerischer Form angegeben.

	Geometrischer Mittelwert und Geometrischer Standardfehler (SEM)			
	EPLC (n=14)			
	Mittel		SEM	
Kontrolle	5068105		1,09	
Cis	3851092**		1,08	
	EPLC (NaBu)		EPLC (Sirtinol)	
	Mittel	SEM	Mittel	SEM
Kontrolle	4386902	1,11	5855085	1,12
NaBu/Sir	3783900 [#]	1,12	5407816 [#]	1,11
Cis	3705965 [#]	1,10	4001903**	1,14
NaBu/Sir + Cis	3790048 [#]	1,12	4076047**	1,11
NaBu/Sir → Cis	3499392 [#]	1,13	4409337**	1,15
Cis → NaBu/Sir	2436690**	1,13	2938243 ^{##}	1,20
	Beas-2B (NaBu)		HCC (NaBu)	
	Mittel	SEM	Mittel	SEM
Kontrolle	2130651	1,27	1951612	1,14
NaBu	1697969	1,39	1758221	1,19
Cis	1766460	1,29	1636636 [#]	1,15
NaBu + Cis	1595368*	1,29	1783378	1,19
NaBu → Cis	1555190*	1,28	2038745	1,13
Cis → NaBu	1381482*	1,33	1813420	1,16

Tab. 10: Geometrische Mittelwerte der Zellzählung nach Inkubation der untersuchten Zelllinien mit Cisplatin und/oder Natriumbutyrat bzw. Sirtinol

5. Ergebnisse

In Tabelle 11 sind die mittleren prozentualen Abnahmen der Zellzahl nach Inkubation der untersuchten Zelllinien mit Cisplatin und/oder Natriumbutyrat bzw. Sirtinol gegenüber der Kontrolle zusammenfassend angegeben.

	Mittlere prozentuale Abnahme und Geometrischer Standardfehler (SEM)									
	EPLC n=14		EPLC NaBu		EPLC Sir		Beas-2B		HCC	
	Mittel	SEM	Mittel	SEM	Mittel	SEM	Mittel	SEM	Mittel	SEM
Kontrolle	0 %	1,00	0 %	1,00	0 %	1,00	0 %	1,00	0 %	1,00
NaBu/Sir	-	-	13,7 %	1,03	7,6 %	1,02	20,3 %	1,12	9,9 %	1,08
Cis	24,0 %	1,05	15,5 %	1,05	31,7 %	1,05	17,1 %	1,12	16,1 %	1,08
NaBu/Sir + Cis	-	-	13,6 %	1,02	30,4 %	1,04	25,1 %	1,12	8,6 %	1,07
NaBu/Sir → Cis	-	-	20,2 %	1,08	24,7 %	1,04	27,0 %	1,07	-4,5 %	1,03
Cis → NaBu/Sir	-	-	44,5 %	1,08	49,8 %	1,10	35,2 %	1,17	7,1 %	1,04

Tab. 11: Mittlere prozentuale Abnahme der Zellzahl nach Inkubation der untersuchten Zelllinien mit Cisplatin und/oder Natriumbutyrat bzw. Sirtinol

5.3. Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der Histonmodifikationen

In Tabelle 12 (siehe S. 81) sind die Ergebnisse der Histonmodifikationen in den unterschiedlichen Zelllinien zusammenfassend angegeben. Die einzelnen Blöcke repräsentieren für jede der Zelllinien die jeweils untersuchten Histonmodifikationen für die unterschiedlichen Versuchsbedingungen, die als Zeilen innerhalb des Blocks dargestellt sind. Dargestellt sind in farbcodierter Form die Quotienten, d. h. relativen Änderungen gegenüber der jeweiligen Kontrolle. Hierbei symbolisiert die Farbe Gelb den Referenzwert (=1,00). Verminderungen des Quotienten relativ zur Kontrolle sind rot, Erhöhungen grün gekennzeichnet; je größer die Abweichung von 1, desto intensiver der Farbton. In blau sind die Signifikanzen (Sig) markiert; die beiden unterschiedlichen Symbole beziehen sich hierbei auf unterschiedliche Vergleiche (siehe Legenden der jeweiligen Tabellen).

Für jeden Block geben die erste und dritte Spalte Mittelwert (Mittel) und Standardabweichung (SD) an, die als geometrische Werte zu verstehen sind, wie in den Einzeltabellen angegeben. Die mittlere, farbig markierte Spalte jedes Blocks enthält die genannten Quotienten zwischen dem jeweiligen Mittelwert und dem Mittelwert der Kontrolle (obere Zeile) und zeigt damit die relative Änderung unter jeder der Versuchsbedingungen an.

Die Tabelle belegt, dass in der HCC-Zelllinie insgesamt geringe Änderungen auftraten (wenig Abweichung von gelb), während bei den EPLC-Zellen vielfach eine Abregulierung (rot) gefunden wurde, hingegen bei den Beas-2B-Zellen überwiegend eine Aufregulierung (grün). Insgesamt verdeutlicht die Tabelle eine ausgeprägte Abregulierung in der Phosphorylierung von H3Ser10 bei der EPLC-Zelllinie sowohl für Natriumbutyrat als auch für Sirtinol, ferner eine Abregulierung der Acetylierung von H3 vor allem unter der letzten der Versuchsbedingungen. Demgegenüber deutet sich bei der Beas-2B-Zelllinie eine Aufregulierung der Gesamtacetylierung von H3 und H4 bei denjenigen Versuchssequenzen an, die Natriumbutyrat einschlossen.

Tab. 12: Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der Histonmodifikationen in den unterschiedlichen Zelllinien

EPLC-Zellen, Cis und NaBu

	Mittel	SD	Sig
Gesamt-Acetylierung H3			
Kontrolle	2,91	1,00	1,10
NaBu	3,61	1,24	1,07
Cis	2,17	0,75	1,27
NaBu+Cis	3,36	1,15	1,14
NaBu→Cis	2,40	0,82	1,15
Cis→NaBu	1,73	0,59	1,21 *
Gesamt-Acetylierung H4			
Kontrolle	0,89	1,00	1,41
NaBu	2,12	2,38	1,24
Cis	0,93	1,04	1,36
NaBu+Cis	2,44	2,74	1,27 *
NaBu→Cis	1,16	1,30	1,29
Cis→NaBu	1,32	1,48	1,32
Phosphorylierung H2B Ser14			
Kontrolle	2,64	1,00	1,29
NaBu	2,25	0,85	1,25
Cis	1,79	0,68	1,16
NaBu+Cis	2,44	0,92	1,35
NaBu→Cis	1,73	0,66	1,21
Cis→NaBu	1,48	0,56	1,12 *
Phosphorylierung H3 Ser10			
Kontrolle	1,82	1,00	1,30
NaBu	1,80	0,99	1,22
Cis	1,09	0,60	1,09
NaBu+Cis	1,05	0,58	1,08
NaBu→Cis	1,05	0,58	1,08
Cis→NaBu	0,91	0,50	1,11 *
Trimethylierung H3 Lys9			
Kontrolle	1,94	1,00	1,13
NaBu	1,98	1,02	1,07
Cis	1,79	0,92	1,13
NaBu+Cis	1,80	0,93	1,12
NaBu→Cis	1,75	0,90	1,14
Cis→NaBu	1,21	0,62	1,23

EPLC-Zellen, Cis und Sir

	Mittel	SD	Sig
Gesamt-Acetylierung H3			
Kontrolle	2,27	1,00	1,22
Sir	2,80	1,23	1,13 *
Cis	1,43	0,63	1,16
Sir+Cis	2,12	0,93	1,18
Sir→Cis	1,91	0,84	1,19
Cis→Sir	0,77	0,34	1,33 #
Gesamt-Acetylierung H4			
Kontrolle	1,23	1,00	1,28
Sir	1,82	1,48	1,23 *
Cis	0,78	0,63	1,19
Sir+Cis	1,65	1,34	1,19
Sir→Cis	1,03	0,84	1,35
Cis→Sir	0,99	0,80	1,32
Phosphorylierung H2B Ser14			
Kontrolle	1,36	1,00	1,31
Sir	1,80	1,32	1,18 *
Cis	0,83	0,61	1,38
Sir+Cis	1,54	1,13	1,14
Sir→Cis	1,21	0,89	1,25
Cis→Sir	1,00	0,74	1,30
Phosphorylierung H3 Ser10			
Kontrolle	2,37	1,00	1,18
Sir	3,14	1,32	1,10
Cis	1,07	0,45	1,25
Sir+Cis	1,86	0,78	1,20
Sir→Cis	1,08	0,46	1,25
Cis→Sir	0,70	0,30	1,31 *
Trimethylierung H3 Lys9			
Kontrolle	2,60	1,00	1,12
Sir	2,97	1,14	1,11
Cis	2,54	0,98	1,19
Sir+Cis	2,76	1,06	1,16
Sir→Cis	2,92	1,12	1,20
Cis→Sir	1,86	0,72	1,13 *

Beas-2B-Zellen, Cis und NaBu

	Mittel	SD	Sig
Gesamt-Acetylierung H3			
Kontrolle	2,27	1,00	1,14
NaBu	3,68	1,62	1,26 *
Cis	2,38	1,05	1,16
NaBu+Cis	3,34	1,47	1,21 *
NaBu→Cis	2,96	1,30	1,19
Cis→NaBu	3,52	1,55	1,17 *
Gesamt-Acetylierung H4			
Kontrolle	0,64	1,00	1,20
NaBu	2,08	3,25	1,24 #
Cis	0,78	1,22	1,13
NaBu+Cis	2,34	3,66	1,19 #
NaBu→Cis	1,08	1,69	1,21 *
Cis→NaBu	1,91	2,98	1,17 #
Phosphorylierung H2B Ser14			
Kontrolle	1,14	1,00	1,24
NaBu	1,40	1,23	1,29
Cis	1,06	0,93	1,33
NaBu+Cis	1,39	1,22	1,30
NaBu→Cis	1,33	1,17	1,34
Cis→NaBu	1,59	1,39	1,32
Phosphorylierung H3 Ser10			
Kontrolle	1,60	1,00	1,30
NaBu	1,28	0,80	1,25
Cis	1,22	0,76	1,24
NaBu+Cis	1,12	0,70	1,26
NaBu→Cis	1,21	0,76	1,16
Cis→NaBu	1,18	0,74	1,21
Trimethylierung H3 Lys9			
Kontrolle	1,64	1,00	1,09
NaBu	1,93	1,18	1,09
Cis	2,00	1,22	1,07
NaBu+Cis	1,96	1,20	1,08
NaBu→Cis	1,67	1,02	1,07
Cis→NaBu	1,76	1,07	1,06

HCC-Zellen, Cis und NaBu

	Mittel	SD	Sig
Gesamt-Acetylierung H3			
Kontrolle	1,32	1,00	1,16
NaBu	1,61	1,22	1,13
Cis	1,43	1,08	1,15
NaBu+Cis	1,38	1,05	1,15
NaBu→Cis	1,19	0,90	1,19
Cis→NaBu	1,18	0,89	1,23
Gesamt-Acetylierung H4			
Kontrolle	0,67	1,00	1,23
NaBu	0,85	1,27	1,14
Cis	0,65	0,97	1,14
NaBu+Cis	0,83	1,24	1,14
NaBu→Cis	0,56	0,84	1,13 *
Cis→NaBu	0,93	1,39	1,06
Phosphorylierung H2B Ser14			
Kontrolle	0,95	1,00	1,15
NaBu	1,09	1,15	1,06
Cis	1,09	1,15	1,08
NaBu+Cis	0,94	0,99	1,10
NaBu→Cis	0,80	0,84	1,15
Cis→NaBu	0,65	0,68	1,23 *
Phosphorylierung H3 Ser10			
Kontrolle	1,11	1,00	1,11
NaBu	1,08	0,97	1,08
Cis	1,11	1,00	1,12
NaBu+Cis	1,02	0,92	1,10
NaBu→Cis	1,01	0,91	1,15
Cis→NaBu	0,89	0,80	1,14
Trimethylierung H3 Lys9			
Kontrolle	1,67	1,00	1,08
NaBu	1,61	0,96	1,08
Cis	1,75	1,05	1,09
NaBu+Cis	1,75	1,05	1,08
NaBu→Cis	1,77	1,06	1,05
Cis→NaBu	1,81	1,08	1,09

6. Diskussion

In der vorliegenden Arbeit wurden Interaktionen zwischen Cisplatin und zwei Klassen von Histon-Deacetylase-Inhibitoren auf die kovalenten Modifikationen von Histonen untersucht. Als Modifikationen wurden einerseits die globale Acetylierung von H3 und H4, andererseits die Phosphorylierung spezifischer Serine an H2B und H3 sowie die Trimethylierung eines Lysins an H3 herangezogen. Diese Modifikationen deckten als Marker einen Bereich von Zellaktivitäten ab, der sich von genereller transkriptioneller Aktivierung bzw. Repression bis hin zu Apoptose und Mitose erstreckte. Verwendet wurden drei verschiedene Zelllinien, um eine mögliche unterschiedliche Sensitivität verschiedener Zelltypen zu berücksichtigen. Die beobachteten komplexen Reaktionsmuster, die im Folgenden im Detail diskutiert werden, stimmten nicht in allen Fällen mit den, allerdings spärlichen, Daten der Literatur zu den untersuchten Aktionen bzw. Interaktionen überein. Die Diskussion bezieht sich jeweils auf die in den einzelnen Tabellen und Abbildungen angegebenen Daten. Zur Verdeutlichung sei ferner auf die farbig codierte Gesamtübersicht verwiesen, die als Tabelle 12 dargestellt ist.

Bemerkenswert erschien vor allem, dass die gleichzeitige und die sequentielle Gabe der verwendeten Agenzien zu unterschiedlichen, teilweise gegenläufigen Ergebnissen auf der Ebene der Histonmodifikationen führte. Die deutlichsten Effekte verglichen mit alleiniger Gabe der Agenzien traten häufig auf, wenn zuerst Cisplatin und sodann der Histon-Deacetylase-Inhibitor appliziert wurden. Ferner waren die Effekte der einen sequentiellen Gabe denen der jeweils anderen Sequenz bzw. der gleichzeitigen Applikation häufig entgegengesetzt. Diese Beobachtungen deuten auch an, dass Cisplatin sowie der Histon-Deacetylase-Inhibitor, falls alleine anwesend, die Zellen in einen regulatorischen Zustand versetzen, in dem sie auf das jeweils andere Agens anders reagieren, als wenn dieses gleichzeitig anwesend ist.

Gemäß einem verbreiteten therapeutischen Konzept beruht das Rationale der kombinierten Therapie darauf, mittels Histon-Deacetylase-Inhibitor die Zelle gegenüber einer nachfolgenden Gabe von Cisplatin zu sensibilisieren. Dies gründet

sich vor allem auf Daten zu Zelltod bzw. Proliferation. Sato *et al.* (2006) berichteten eine Potenzierung der Wirkung von Cisplatin und Oxaliplatin durch gleichzeitige Applikation von Natriumbutyrat in einer relativ niedrigen Konzentration von 0,5 mM. Die Konzentration von Cisplatin bewegte sich zwischen 5 und 20 μM ; hierbei trat der potenzierende Effekt von Natriumbutyrat bis zu einer Konzentration von 10 μM auf. In ähnlicher Weise fanden Ozaki *et al.* (2008), dass Histon-Deacetylase-Inhibitoren, die zu einer Relaxation der DNA-Chromatin-Struktur führten, Tumorzellen für eine nachfolgende Cisplatin-Gabe sensibilisierten; untersucht wurden sechs verschiedene Ovarial-Tumorzelllinien. Die potenzierenden Effekte traten bei Cisplatin-Konzentrationen von bis zu 40 μM auf. Auch wurde beobachtet, dass Cisplatin-resistente Zellen stärker auf die kombinierte Gabe von Histon-Deacetylase-Inhibitor und Cisplatin reagierten als Cisplatin-sensitive Zellen. Dieser Befund unterstreicht in besonderem Maße die Sinnhaftigkeit des therapeutischen Ansatzes, da Cisplatin-Resistenz ein ernsthaftes klinisches Problem darstellt. Zugleich allerdings belegt diese Arbeit, so wie andere Arbeiten, dass die Ergebnisse mindestens in gewissem Maße von der untersuchten Zelllinie abhängen, sowie ebenfalls von der Cisplatin-Konzentration und dem Typ des Histon-Deacetylase-Inhibitors.

6.1. Wirkungen auf die Zellzahl

In der vorliegenden Untersuchung waren bezüglich des Effektes auf die Zellzahl keine synergistischen Wirkungen innerhalb des untersuchten Zeitraums apparent, wenn ein HDAC-Inhibitor vor Cisplatin gegeben wurde (vgl. Abb. 13b, 13c, 13d, 13e). Insgesamt allerdings waren die Effekte der verwendeten Agenzien auf die Zellzahl eher moderat. Daher ist es unwahrscheinlich, dass mögliche Kombinationseffekte durch eine von vornherein starke Antwort im Sinne einer massiven Reduktion der Zellzahl verdeckt wurden. Auch waren die Konzentrationen der verwendeten Agenzien so gewählt, dass ausgeprägte toxische Effekte vermieden wurden; dies gilt vor allem für Cisplatin, bei dem die verwendete Konzentration von 10 μM im Bereich der Konzentrationen lag, die bei einer Chemotherapie erreicht werden sowie von anderen Untersuchern verwendet wurden.

Die Gabe von Cisplatin führte in der EPLC-Zelllinie zu einer signifikanten Reduktion der Zellzahl. Ähnliche Effekte ergaben sich durch die HDAC-Inhibitoren, wenn diese separat oder in Kombination mit Cisplatin appliziert wurden. Die Ausnahme stellte hierbei die sequentielle Gabe von zuerst Cisplatin und nachfolgend einem HDAC-Inhibitor dar; in diesem Fall war der Effekt gegenüber den anderen Expositionen und der Kontrolle deutlich verstärkt. Bemerkenswerterweise ergaben beide untersuchten HDAC-Inhibitoren (Natriumbutyrat und Sirtinol) nur in der genannten Reihenfolge (zuerst Cisplatin, dann HDAC-Inhibitor) eine deutliche Abnahme der Zellzahl im Vergleich zu Cisplatin als alleiniges Agens. Die gleichzeitige oder vorherige Gabe des HDAC-Inhibitors zeigte keine signifikanten Unterschiede gegenüber Cisplatin alleine. Die EPLC-Zelllinie schien somit durch Cisplatin in einen Zustand versetzt zu werden, in dem sie sensitiver auf einen HDAC-Inhibitor reagierte.

Die Bronchialepithelzelllinie Beas-2B zeigte ein anderes Bild. Hier fand sich kein statistisch signifikanter Effekt von Cisplatin oder Natriumbutyrat bei alleiniger Gabe; allerdings ist die im Vergleich zu den EPLC-Versuchen kleinere Fallzahl in Rechnung zu stellen. Eine signifikante Reduktion der Zellzahl wurde erst durch eine gleichzeitige oder sequentielle Gabe von Cisplatin und Natriumbutyrat erreicht. Hierbei schien sich der Effekt auf die Reduktion der Zellzahl relativ zur Kontrolle im Vergleich zur Gabe der Einzelkomponenten zu addieren, allerdings erlaubte die Fallzahl nicht, diese Hypothese zu testen. Zwischen den verschiedenen Reihenfolgen der Exposition zeigte sich ebenfalls kein signifikanter Unterschied, auch wenn tendenziell die Applikation von Cisplatin gefolgt von Natriumbutyrat ähnlich wie bei den EPLC-Zellen den stärksten Effekt zeigte.

Die HCC-Zelllinie zeigte wieder ein anderes Bild. Hier wurde eine signifikante Reduktion der Zellzahl lediglich durch die alleinige Gabe von Cisplatin erreicht. Die Gabe von Natriumbutyrat in verschiedenen Kombinationen führte zu keinem weiteren Rückgang der Zellzahl, im Gegenteil zeigte sie eine Tendenz, den Cisplatin-Effekt sogar wieder aufzuheben. Mit diesen Beobachtungen ging der Befund konform, dass Cisplatin im Allgemeinen bei den HCC-Zellen keine signifikanten Wirkungen auf die Histonmodifikationen ausübte (siehe unten). Bei diesen Zellen, die bezüglich der Zellzahl schwach oder gar nicht auf die Agenzien reagierten, waren

bemerkenswerterweise die Wirkungen von Natriumbutyrat der Tendenz nach gleich, wenn Natriumbutyrat bis unmittelbar vor Ende der Exposition anwesend war, unabhängig davon, ob gleichzeitig oder vorher Cisplatin appliziert worden war. Die vorliegenden Daten können nicht die Frage beantworten, ob dieser Effekt auf eine spontane Erholung während der Exposition gegenüber Natriumbutyrat zurückging oder von diesem aktiv induziert wurde. Als Folgerung ist festzuhalten, dass die HCC-Zellen keinen Hinweis auf eine positive synergistische Wirkung von Cisplatin und Natriumbutyrat ergaben, weder auf der Ebene der Zellzahl noch auf der Ebene der untersuchten kovalenten Histonmodifikationen.

Bemerkenswert erschien in jedem Fall, dass die initiale Gabe eines HDAC-Inhibitors nicht zu einer wesentlichen Verstärkung des Effektes von Cisplatin führte. Analog der obigen Argumentation ließe sich einwenden, dass eine längere Wartezeit nach Gabe von Cisplatin einen solchen Effekt möglicherweise ergeben hätte. Auch hier jedoch sprechen die Beobachtungen an den HCC-Zellen gegen eine solche Erklärung. Die mit Natriumbutyrat, teils auch die mit Sirtinol erhaltenen Daten zur Acetylierung von H3 weisen in die Richtung, dass die akuten Effekte des HDAC-Inhibitors bei nachfolgender Gabe von Cisplatin nicht erhalten blieben (siehe unten). Darin äußerte sich vermutlich der relativ kurzfristige regulatorische Charakter des überwiegenden Teiles der mit dem verwendeten Antikörper erfassbaren Gesamt-Acetylierung.

6.2. Die Zellzahl in Beziehung zu Histonmarkern für Apoptose und Mitose

Es ist allerdings nicht ausgeschlossen, dass die einzelnen Agenzien oder ihre Kombination zu einer relativen Änderung der Anteile von programmiertem Zelltod (Apoptose) zu Nekrose führten. Dieser Endpunkt wurde in der vorliegenden Arbeit nicht direkt untersucht, wohl aber indirekt insofern, als die Phosphorylierung von Serin 14 auf dem Histon H2B als ein relativ spezifischer, früher Marker für eine Apoptose angenommen werden darf [Cheung *et al.*, 2003]. In der vorliegenden Untersuchung ergaben sich bei den Beas-2B-Zellen keine Anzeichen für eine wesentliche Änderung dieses Markers in Abhängigkeit von Cisplatin oder den verschiedenen Expositionsmodi, die Cisplatin enthielten (vgl. Abb. 11c). Ähnliche Ergebnisse fanden sich bei der Tumorzelllinie HCC (vgl. Abb. 12c). Die

Tumorzelllinie EPLC hingegen lieferte ein anderes Ergebnis, da eine statistisch signifikante Reduktion der Phosphorylierung auftrat, die eher für eine reduzierte als eine gesteigerte Apoptose sprach (vgl. Abb. 8c, 9c, 10c). Da nach allgemeiner Annahme Cisplatin sowohl eine Apoptose als auch eine Nekrose von Zellen induziert, ist der Befund, dass auch die Phosphorylierung von Serin 14 an H2B nach Gabe von Cisplatin in keinem Fall zunahm, schwer erklärbar. In jedem Fall lieferten die Daten einen deutlichen Hinweis darauf, dass *in vitro*-Befunde nicht über menschliche Zelltypen generalisiert werden können.

Verglichen mit der Acetylierung ist die Phosphorylierung von Histonen ein Prozess, der in besonderem Maße kurzfristigen dynamischen Regulierungen unterworfen ist. Die Phosphorylierung von Serin 10 am Histon H3 kann aufgrund der Literaturbefunde [Hans & Dimitrov, 2001] als Marker mitotischer Aktivität interpretiert werden. Insofern scheint die Beobachtung einer durch Cisplatin verminderten Phosphorylierung von Serin 10 (vgl. Abb. 8d, 9d, 10d) plausibel, da die Gabe von Cisplatin darauf abzielt, ein Sistieren der Zellteilung zu bewirken. Dieser Effekt trat allerdings nur bei der EPLC-Zelllinie zutage, während bei der Beas-2B- sowie der HCC-Zelllinie ein schwächerer oder gar kein Effekt auftrat (vgl. Abb. 11d und 12d). Andererseits wurde in der Literatur eine vermehrte Phosphorylierung von Serin 10 auf H3 nach Cisplatin-Exposition beschrieben [Wang & Lippard, 2004]. Möglicherweise ist die Diskrepanz zwischen diesen Befunden, ebenso wie für H2B an Ser14 (siehe oben), durch den Unterschied der Cisplatinkonzentrationen zu erklären. Wang und Lippard (2004) verwendeten eine Konzentration von 1 μM Cisplatin, während in den vorliegenden Experimenten 10 μM eingesetzt wurden. Diese höhere Konzentration basierte auf einer Abschätzung der *in vivo*-Exposition während eines Zyklus der Chemotherapie. Als weitere mögliche Erklärungen könnten Unterschiede der verwendeten Zelllinien sowie der Expositionsregimes herangezogen werden; allerdings reichen die vorliegenden Daten nicht aus, um zwischen den verschiedenen Erklärungsmöglichkeiten zu unterscheiden.

.6.3. Wirkungen auf die Histon-Acetylierung

Bezüglich kombinierter Effekte auf die Histon-Acetylierung liegen nur wenige Daten in der Literatur vor. Rikiishi *et al.* (2007) beobachteten auf der einen Seite eine Verstärkung der Cisplatin-induzierten Apoptose durch den HDAC-Inhibitor SAHA, vor allem auf dem mitochondrial vermittelten Weg. Auf der anderen Seite erfassten diese Autoren die HDAC-Aktivität. Diese wurde durch SAHA kurzzeitig reduziert, war hingegen nach 24 Stunden wieder weitgehend normalisiert. Im Gegensatz dazu führte Cisplatin zu einer zeitabhängigen Abnahme der HDAC-Aktivität. Die Autoren spekulieren, dass die verstärkenden Effekte des HDAC-Inhibitors auf die Cisplatin-induzierte Apoptose unter anderem auf einer Störung der Redox-Balance beruhen. Die Histon-Acetylierung als Resultante der HDAC- und HAT-Aktivität einerseits und der Chromatin-Integrität andererseits wurde in dieser Arbeit nicht erfasst.

In der vorliegenden Arbeit wurden in der Tat Änderungen der Acetylierung von H3 und H4 beobachtet. Allerdings unterschieden sich die Effekte zwischen den EPLC-, Beas-2B- und HCC-Zellen. Bei den EPLC-Zellen war bei Gabe von Cisplatin alleine eine statistisch signifikante Abnahme der Gesamt-Acetylierung von H3 (vgl. Abb. 8a, 9a, 10a) und tendenziell auch H4 (vgl. Abb. 8b) zu beobachten. Im Gegensatz dazu zeigten die Beas-2B- und die HCC-Zellen keinerlei Änderung der Acetylierung von H3 und H4 bei alleiniger Exposition gegenüber Cisplatin (vgl. Abb. 11a, 11b, 12a, 12b).

Den Effekten von Cisplatin entgegengesetzt waren die Effekte der HDAC-Inhibitoren. Wie zu erwarten, fand sich nach alleiniger Gabe eines HDAC-Inhibitors ein Anstieg der Gesamt-Acetylierung von H3 und H4. In diesem Sinne reagierte die EPLC-Zelllinie sowohl auf Natriumbutyrat als auch auf Sirtinol; eine statistische Signifikanz ergab sich jedoch nur für Sirtinol (vgl. Abb. 9a, 9b, 10a, 10b). Vor allem jedoch zeigten die Beas-2B-Zellen einen markanten Anstieg der Acetylierung von H3 und H4 nach Gabe von Natriumbutyrat (vgl. Abb. 11a, 11b). Hingegen waren diese Effekte bei den HCC-Zellen allenfalls angedeutet (vgl. Abb. 12a, 12b).

Im Vergleich dazu waren die Wirkungen einer kombinierten bzw. sequentiellen Gabe von Cisplatin und einem HDAC-Inhibitor deutlich komplexer. Bei den Beas-2B-Zellen fanden sich nach wie vor deutliche Anstiege der Gesamt-Acetylierung von H3 und H4 dann, wenn vor Ende der Exposition der HDAC-Inhibitor präsent war. Dies war der Fall, wenn Natriumbutyrat und Cisplatin gemeinsam gegeben wurden oder wenn Cisplatin von Natriumbutyrat gefolgt war (vgl. Abb. 11a, 11b). Wurde hingegen Natriumbutyrat von Cisplatin gefolgt, so war die Acetylierung insbesondere von H4 im Vergleich zur Gabe von Natriumbutyrat alleine reduziert. Die einfachste Erklärung läge darin, dass die Effekte von Natriumbutyrat kurzzeitiger Natur sind und durch Cisplatin nicht gehalten werden können. Bis zur Ernte der Zellen war eine Zeit von ca. 8 Stunden vergangen, in der die Wirkung von Natriumbutyrat offenbar zum Teil verloren gehen konnte. Die Anwesenheit von Cisplatin in einer Konzentration von 5 µg/ml (entsprechend 16,7 µM) hatte in der Arbeit von Rikiishi *et al.* (2007) bereits nach 4 Stunden einen deutlichen reduzierenden Effekt auf die HDAC-Aktivität, der im Mittel von dem statistisch signifikanten Effekt nach 24 Stunden nicht wesentlich verschieden war. Somit wäre es durchaus plausibel gewesen, die Beibehaltung oder Verstärkung der globalen Histon-Acetylierung zu erwarten. Bezüglich H4, nicht jedoch H3 waren diese Effekte auch bei den HCC-Zellen angedeutet (vgl. Abb. 12a, 12b). Die Beas-2B-Zellen schienen jedoch in besonderem Maße gegenüber der inhibitorischen, akuten Wirkung von Natriumbutyrat empfindlich.

Die EPLC-Zellen zeigten ein anderes Verhalten, insbesondere dann, wenn nach Gabe von Cisplatin der HDAC-Inhibitor appliziert wurde. Dies galt sowohl für Natriumbutyrat (vgl. Abb. 9a, 9b) als auch für Sirtinol (vgl. Abb. 10a, 10b). Nach Gabe von Cisplatin gefolgt vom HDAC-Inhibitor war bezüglich H3 die Acetylierung verglichen mit der Gabe des HDAC-Inhibitors alleine oder auch den anderen Kombinationen deutlich weniger ausgeprägt. Dies spricht dafür, dass der inhibitorische Effekt von Cisplatin auf die Acetylierung den förderlichen Effekt des HDAC-Inhibitors dominierte. Ein solcher Effekt trat offenbar nicht auf, wenn Cisplatin und der HDAC-Inhibitor gleichzeitig gegeben wurden. Eine mögliche Erklärung läge darin, dass der HDAC-Inhibitor in sehr kurzer Zeit seine Wirkung entfaltet und die Acetylierung verstärkt, während Cisplatin erstens längere Zeit benötigt und zweitens nicht in der Lage ist, den einmal eingetretenen Effekt des HDAC-Inhibitors

rückgängig zu machen. Wenn hingegen zuerst Cisplatin gegeben wird, ist die Zelle derartig geschädigt oder zumindest nachhaltig beeinflusst, dass der HDAC-Inhibitor wirkungslos bleibt.

Auf der einen Seite unterstreichen diese Überlegungen das Konzept, mittels HDAC-Inhibitor für die Wirkung von Cisplatin zu sensibilisieren, denn bei umgekehrter Reihenfolge bleibt der HDAC-Inhibitor zumindest auf der Ebene der Histon-Acetylierung wirkungslos. Auf der anderen Seite wurde die reduzierende Wirkung von Cisplatin auf die Histon-Acetylierung durch die nachfolgende Gabe eines HDAC-Inhibitors verstärkt (vgl. Abb. 9a, 10a).

Der Aufbau der Versuche erlaubt jedoch nicht, diesen Effekt von einem reinen Zeiteffekt zu trennen, da bei Gabe von Cisplatin gefolgt vom HDAC-Inhibitor weitere 8 Stunden vergangen waren, in denen sich die Wirkung von Cisplatin entfalten konnte. Diese Erklärung ist jedoch insofern nicht völlig zufriedenstellend, als bei den Beas-2B- und HCC-Zellen ein solcher potenzieller Effekt der zusätzlich verfügbaren Zeit nicht zu beobachten war. Im Gegenteil waren die Wirkungen des HDAC-Inhibitors nach Gabe von Cisplatin größer als die der alleinigen Gabe von Cisplatin (siehe Abb. 11a, 11b) oder ihr ähnlich (siehe Abb. 12a, 12b). Verglichen mit der Kontrolle hatte Cisplatin alleine bei diesen Zellen im Gegensatz zu den EPLC-Zellen keine Effekte. Andererseits war Cisplatin bei den Beas-2B-Zellen nicht ganz ohne Wirkung, denn zumindest bezüglich H4 war verglichen mit dem HDAC-Inhibitor alleine oder der gleichzeitigen Gabe eine Reduktion der Acetylierung zu erkennen, wenn Cisplatin nach dem HDAC-Inhibitor appliziert wurde. Hier allerdings lässt sich als Einwand vorbringen, dass die Wirkung des HDAC-Inhibitors in den 8 Stunden, in denen Cisplatin auf die Zellen einwirken konnte, verloren ging, da die Histon-Acetylierung einen relativ dynamischen Vorgang darstellt. Hiermit stimmen die Beobachtungen an den EPLC-Zellen überein, dass die Histon-Acetylierung etwa vergleichbar dem Kontrollwert war, wenn Cisplatin nach dem HDAC-Inhibitor gegeben wurde (vgl. Abb. 9a, 9b, 10a, 10b).

Die Gabe von Cisplatin alleine führte gegenüber den Kontrollen nicht zu Änderungen der globalen Acetylierung der Histone H3 und H4 bei den Beas-2B-Zellen (Abb. 11a,

11b). Im Gegensatz dazu war bei den EPLC-Zellen eine Abnahme der Acetylierung von H3 zu beobachten (Abb. 8a, 9a, 9b, 10a, 10b). Bezüglich H4 trat ebenfalls der Tendenz nach eine Abnahme ein, allerdings war diese nicht statistisch signifikant (Abb. 8b). Im Gegensatz zu dem Verlust an Acetylierung bei sequentieller Gabe sind diese Beobachtungen mit der oben geschilderten inhibitorischen Aktivität von Cisplatin auf die HDAC vereinbar [Rikiishi *et al.*, 2007]. Zugleich suggerieren sie eine insgesamt veränderte transkriptionelle Aktivität, insbesondere in Anbetracht der Tatsache, dass vermutlich nur ein Bruchteil der Gesamt-Acetylierung spezifisch regulatorisch bedeutsam ist. Während in früheren Arbeiten die vermehrte Acetylierung eher mit einer transkriptionellen Aktivierung als Deaktivierung verknüpft wurde [He & Lehming, 2003], zeigen neuere Daten ein sehr viel differenzierteres Bild einschließlich der Tatsache, dass lokal an regulatorisch bedeutsamen Stellen Deacetylierung nach Gabe des HDAC-Inhibitors Natriumbutyrat auftreten kann [Rada-Iglesias *et al.*, 2007]. In Anbetracht dieser neueren Befunde ist unklar, inwieweit Änderungen der globalen Acetylierung der Histone mit einer im Mittel gesteigerten transkriptionellen Aktivität einhergehen. Dies betrifft auch das Ergebnis dieser Arbeit, dass der Effekt bezüglich H3 konsistenter ausfiel als für H4. Daraus kann nicht gefolgert werden, dass eine H3-spezifische Acetylierung bzw. ihre Änderungen stärkere Effekte gehabt haben muss als die mit H4 assoziierte Acetylierung.

6.4. Methodologische Erwägungen und Integration der Befunde

Diese Beobachtungen und Überlegungen weisen zum einen darauf hin, dass die verwendeten Zellarten deutlich unterschiedliche Reaktionsmuster auf Cisplatin und einen HDAC-Inhibitor zeigten. Zum anderen unterstreichen sie die methodologischen Probleme in der Konzeption derartiger Versuche. Demzufolge sind bei der Interpretation der beschriebenen Befunde einige Einschränkungen zu beachten. Diese Einschränkungen sind im Wesentlichen in den Erfordernissen begründet, den Zeitablauf der Versuche bzw. Expositionen aufeinander abzustimmen und auf diese Weise eine Vergleichbarkeit zu gewährleisten.

Bei der alleinigen Gabe von Cisplatin oder dem HDAC-Inhibitor und ihrer simultanen Gabe war gewährleistet, dass der Beginn der Exposition sowie ihr Ende mit nachfolgender Zellzählung bzw. Proteingewinnung zu den exakt gleichen Zeitpunkten stattfanden. Daher spiegeln die beobachteten Effekte die akute Wirkung der Agenzien innerhalb eines Zeitraumes von 8 Stunden wider und sind direkt miteinander vergleichbar. Insbesondere galt dies für den Effekt von Cisplatin im Sinne einer Reduktion der Acetylierung (EPLC-Zellen) oder keiner Änderung.

Bei der sequentiellen Gabe ergab sich die Schwierigkeit, auf der einen Seite die Dauer der Exposition gegenüber den Einzelkomponenten den jeweiligen anderen Expositionen vergleichbar zu halten, andererseits aufgrund der doppelten benötigten Gesamtexpositionsdauer zu vergleichbaren Zeitpunkten die Auswertung vorzunehmen.

Grundsätzlich wäre es möglich gewesen, nach der Exposition gegenüber Cisplatin oder dem HDAC-Inhibitor alleine weitere 8 Stunden zu warten, bevor die Analyse erfolgte. Allerdings wäre in diesem Falle bei sequentieller Exposition insofern keine Vergleichbarkeit gegeben, als hierbei die akuten Effekte der zuletzt gegebenen Komponente mit bereits 8 Stunden zurückliegenden Effekten der Exposition gegenüber den Einzelkomponenten oder der gemeinsamen Gabe verglichen worden wären. In diesem Falle hätte sich die Möglichkeit ergeben, dass temporäre Effekte der Einzelexpositionen wieder teilweise verschwunden gewesen wären. Dies hätte es nicht mehr erlaubt, die akuten Effekte miteinander direkt zu vergleichen. Da der Ausgangspunkt der Untersuchung die mögliche Sensibilisierung gegenüber einer Komponente durch die vorherige Gabe einer anderen Komponente war, schien es vorteilhafter, die Vergleichbarkeit der akuten Effekte der jeweils zuletzt gegebenen Komponente zu gewährleisten. Dies war der Grund, warum das Zeitschema der Versuche in der hier beschriebenen Weise gewählt wurde.

Theoretisch wäre es denkbar, dass die Beobachtung eines besonders starken Effektes auf die Acetylierung von H3 bei sequentieller Gabe von Cisplatin und einem HDAC-Inhibitor bei den EPLC-Zellen auf eine über die Zeit kumulierende Wirkung von Cisplatin zurückzuführen war (vgl. Abb. 9a, 10a). Bei den Beas-2B-Zellen war

dieser Kombinationseffekt nicht vorhanden (Abb. 11a, 11b). Allerdings war er bezüglich H4 angedeutet im Vergleich zur Gabe der Agenzien, wenn diese in umgekehrter Reihenfolge oder simultan erfolgte; jedoch waren diese Effekte nicht signifikant verschieden (vgl. Abb. 11b). Gegen die Allgemeingültigkeit dieser Erklärung spricht, dass zumindest bei der HCC-Zelllinie, die bezüglich H4 einen signifikanten Effekt von Cisplatin zeigte, falls dieses zuletzt gegeben wurde, eine Verstärkung des Effekts bei nachfolgender Gabe von Natriumbutyrat nicht einmal der Tendenz nach angedeutet war (vgl. Abb. 12b). Dies legt nahe, dass kumulative zytotoxische Wirkungen von Cisplatin nach Wegnahme der Noxe *per se* stark von der Zelllinie abhängen bzw. die Effekte von Cisplatin in differentieller Weise durch einen nachfolgend applizierten HDAC-Inhibitor verstärkt werden. Auch die Beobachtung einer reduzierten Gesamt-Acetylierung von H3 bei den EPLC-Zellen nach Gabe von Cisplatin gefolgt von einem HDAC-Inhibitor (Natriumbutyrat, vor allem jedoch Sirtinol) spricht dafür, dass die Zellen am Ende des Versuches in einem anderen regulatorischen Zustand waren als bei simultaner Gabe dieser Agenzien. Zumindestens für Natriumbutyrat führte die gleichzeitige Gabe zum gleichen oder stärkeren Anstieg der Acetylierung wie die alleinige Gabe des HDAC-Inhibitors (vgl. Abb. 9a, 9b). Die Befunde bei gleichzeitiger Gabe deuten darauf hin, dass Cisplatin in der eingesetzten Konzentration keineswegs von vornherein den Effekt eines HDAC-Inhibitors unterband.

Die vorliegenden Daten widersprechen allerdings den Beobachtungen, die von Wang und Lippard (2004) berichtet wurden. Dies gilt um so mehr, als in dieser Untersuchung die vermehrte globale Acetylierung von H4 in dosisabhängiger Weise über einen breiten Bereich von Konzentrationen auftrat, darunter auch bei der Konzentration von 10 μM Cisplatin, wie sie in der vorliegenden Untersuchung Anwendung fand. Aus diesem Grunde kann der Unterschied der Histon-Deacetylierung im Vergleich zu den vorliegenden Ergebnissen vermutlich nicht durch unterschiedliche Wirkungen verschiedener Cisplatin-Konzentrationen erklärt werden. Da die Versuchsprotokolle auch hinsichtlich der Expositionsdauer von 8 Stunden vergleichbar waren, entfällt die mögliche Erklärung durch die zeitliche Dynamik der Antwort auf Cisplatin ebenfalls. Zudem sind die klassischen Effekte von Cisplatin auf die DNA bereits nach weniger als 8 Stunden nachweisbar [Temple *et al.*, 2000], und

die Acetylierung von Histonen stellt in der Regel einen relativ rasch verlaufenden Prozess dar. Aus diesem Grunde ist anzunehmen, dass die wesentlichen Effekte von Cisplatin auf die Histon-Acetylierung bereits vor dem Zeitpunkt 8 Stunden eintreten. Eine mögliche Erklärung könnte in dem Unterschied der verwendeten Zelllinien liegen. In der vorliegenden Untersuchung wurden EPLC-Zellen eingesetzt, die ein etabliertes Modell eines Plattenepithelkarzinoms darstellen. Hingegen verwendeten Wang und Lippard HeLa-Zellen, bei denen die Immortalisierung zum Teil auf einer Inaktivierung des Tumorsuppressorgens p53 beruht, die durch vermehrte Degradation hervorgerufen wird, welche auf die Wirkungen einer HPV(human papilloma virus)-vermittelten Aktivität unter anderem des E6-Proteins zurückführbar ist [Goodwin & DiMaio, 2000]. Andererseits wurde gezeigt, dass Cisplatin die Expression des E6-Proteins bei diesen Zellen reduzieren kann [Wesiereska-Gadek *et al.*, 2002]. In Anbetracht der Komplexität der Zellzyklusregulation ist dennoch ohne weiteres denkbar, dass das gegensätzliche Verhalten auf einer unterschiedlichen genetischen Ausstattung bzw. Modifikation der verschiedenen Zelllinien beruht. In jedem Fall scheint zumindest bei der relativ hohen Konzentration von 10 µM Cisplatin ein Effekt, der mit einer generellen transkriptionellen Suppression einhergeht, plausibler als eine Hyper-Acetylierung, die in der Regel mit vermehrter Transkription assoziiert ist.

6.5. Schlussfolgerung und Ausblick

Die vorliegende Arbeit zeigte auf der Ebene der Histon-Modifikationen deutlich unterschiedliche Effekte der drei verschiedenen untersuchten Zelllinien auf die Exposition gegenüber Cisplatin und einem Histon-Deacetylase-Inhibitor. Auch auf der Ebene der Zellzahl bestanden Reaktionsunterschiede. Die Interpretation der unterschiedlichen Reaktionsmuster war dadurch erschwert, dass die sequentielle Gabe notwendigerweise andere Gesamtexpositionszeiten beinhaltet. Daher ließen sich die akuten Wirkungen einzelner Substanzen unabhängig davon, ob gleichzeitig oder alleine appliziert, gut miteinander vergleichen. Die Testung von Kombinationseffekten bei sequentieller Gabe wurde jedoch möglicherweise dadurch beeinflusst, dass längere Zeit für die Wirkung einer einzelnen Komponente zur Verfügung stand oder umgekehrt akute Effekte sich wieder über die Zeit verloren.

Diese offenen Fragen würden sich nur durch zusätzliche, allerdings vom Umfang aufgrund der vielen Kombinationen recht aufwendige Versuche zur zeitlichen Kinetik der Effekte klären lassen.

Die auffälligen – und in diesem Ausmaß unerwarteten – Unterschiede der Reaktion zwischen den einzelnen Zelllinien unterstreichen, dass *in vitro*-Befunde nicht über menschliche Zellen generalisiert werden können und werfen die Frage auf, inwieweit Ergebnisse wie die vorliegenden auf den Menschen übertragbar sind. Dies wird auch dadurch untermauert, dass bezüglich der Histon-Veränderungen die hier erhaltenen Ergebnisse den Literaturbefunden völlig entgegenstehen. Möglicherweise hängt gerade der Effekt auf Histonmodifikationen in kritischer Weise von den verwendeten Konzentrationen und Expositionsdauern ab. Da an dieser Stelle Beobachtung gegen Beobachtung steht, ist die Frage, welche Reaktionsmuster Cisplatin hervorrufen kann, zur Zeit nicht als geklärt zu betrachten.

Unabhängig davon erscheint eine durch Cisplatin induzierte Abnahme der Gesamt-Acetylierung, welche nach allgemeiner Annahme mit einer transkriptionellen Repression verbunden ist, plausibler als eine Hyperacetylierung, welche in der Regel mit einer Erhöhung der transkriptionellen Aktivität einhergeht. Dessen ungeachtet müssen künftige Untersuchungen klären, ob die hier gefundene Verminderung der Histon-Acetylierung ein Epiphänomen darstellt oder kausal an den Wirkungen von Cisplatin beteiligt ist.

7. Zusammenfassung

Cisplatin-Verbindungen haben einen festen Stellenwert in der Chemotherapie von Tumorerkrankungen. Da ihre Wirkung allerdings wenig spezifisch für Tumorzellen ist und sich Resistenzen entwickeln, gibt es nach wie vor einen Bedarf für Verbesserungen oder Alternativen. Hierbei bieten sich unter anderem Inhibitoren der Histon-Deacetylasen (HDAC) an, die in das dynamische Gleichgewicht von Acetylierung und Deacetylierung der Histone eingreifen und mittels der Chromatinstruktur die Transkription Zellzyklus-relevanter Gene beeinflussen können. Diese Inhibitoren werden zum einen als Monotherapie erprobt, zum anderen in Kombination mit Cisplatin, um die Sensitivität gegenüber dieser Verbindung zu erhöhen. Andererseits wurde in der Literatur berichtet, dass Cisplatin selbst die kovalenten Modifikationen der Histone, darunter die Acetylierung beeinflussen kann.

In der vorliegenden Untersuchung sollte eruiert werden, welche Effekte auf Histone Cisplatin ausübt, wenn es alleine oder in Kombination mit zwei verschiedenen HDAC-Inhibitoren entweder gleichzeitig oder in verschiedener Reihenfolge appliziert wird. Als Zelllinien fanden drei Epithelzelllinien Anwendung, darunter normale Zellen (Beas-2B), Plattenepithelkarzinom-Zellen (EPLC) und Adenokarzinom-Zellen (HCC). Als HDAC-Inhibitoren wurden Natriumbutyrat (NaBu, 5 mM) als relativ unspezifischer, breitbandiger Inhibitor, sowie Sirtinol (Sir, 20 μ M; nur EPLC) als Inhibitor einer spezifischen Klasse von Histon-Deacetylasen (Sirtuine) verwendet. Die Zellen wurden in Kulturschalen für jeweils 8 Stunden gegenüber Kontrollmedium, Cisplatin in einer therapeutisch relevanten Konzentration (10 μ M), einem HDAC-Inhibitor oder der Kombination beider ausgesetzt. Darüber hinaus wurden beide Komponenten für jeweils 8 Stunden in der einen oder anderen Reihenfolge gegeben. Als Messgröße dienten die *per* direkter Zählung bestimmte Zellzahl sowie ausgewählte Histonmodifikationen. Zu diesen zählten die Gesamt-Acetylierung der Histone H3 und H4, die Phosphorylierung von Histon H2B an Serin 14 als Apoptosemarker, sowie von Histon H3 an Serin 10 als Mitosemarker, ferner die Trimethylierung von Histon H3 an Lysin 9 als Marker potenzieller längerfristiger regulatorischer Änderungen. Die Analysen erfolgten mittels Western Blot und normierter Densitometrie der erhaltenen Proteinbanden.

Cisplatin bewirkte eine signifikante Abnahme der Zellzahl bei allen drei Zelllinien. Die Effekte der Kombinationen fielen unterschiedlich aus; bei den EPLC- und Beas-2B-Zellen waren sie am stärksten, wenn nach Cisplatin NaBu oder Sir gegeben wurde. Bezüglich der Histon-Acetylierung fand sich eine signifikante Reduktion der Gesamt-Acetylierung von H3 nach Cisplatin. Gleiches galt für die Phosphorylierungen von H2B und H3, während die Trimethylierung von H3 unbeeinflusst war. Die Effekte von Cisplatin auf die Acetylierung und Phosphorylierung waren den in der Literatur berichteten entgegengesetzt. Die HDAC-Inhibitoren bewirkten, wie zu erwarten, eine Zunahme der Gesamt-Acetylierung und im Falle der EPLC-Zellen auch eine Zunahme der Phosphorylierung an H2B. Wenn vorher Cisplatin gegeben wurde, trat bei diesen Zellen eine Abnahme der Acetylierung sowie der Phosphorylierungen an H2B und H3 und der Trimethylierung an H3 auf. Bei den Beas-2B- und HCC-Zellen waren derartige Effekte nicht zu beobachten, außer der massiven Zunahme der Acetylierung von H3 und H4 nach Gabe von NaBu. Die Applikation der Komponenten in der Reihenfolge HDAC-Inhibitor gefolgt von Cisplatin führte weder bezüglich der Zellzahl noch bezüglich der Histonmodifikationen zu besonders ausgeprägten Effekten. Die Wirkungen von Sirtinol waren ungeachtet seines engeren Wirkungsspektrums ebenso stark wie die von Natriumbutytrat.

Diese Beobachtungen unterstreichen zum einen die markanten Unterschiede der Reaktion verschiedener Zelllinien auf Cisplatin sowie HDAC-Inhibitoren. Im Gegensatz zu dem in einer vorherigen Studie berichteten Befund bewirkte Cisplatin eine Reduktion der Gesamt-Acetylierung der Histone H3 und H4, keineswegs eine Zunahme. Die kombinierte Gabe, vor allem in der Reihenfolge HDAC-Inhibitor gefolgt von Cisplatin, hatte nicht die erwarteten besonders starken Effekte. Diese traten im Gegenteil bei umgekehrter Reihenfolge auf. Wenn auch die Interpretation der Daten Einschränkungen unterliegt, die in unvermeidlichen Problemen der zeitlichen Vergleichbarkeit begründet sind, so lassen sie doch die Schlussfolgerung zu, dass Kombinationseffekte von HDAC-Inhibitoren und Cisplatin komplexer sind als erwartet und *in vitro*-Modelle dieser Wirkung in hohem Maße von den Versuchsbedingungen und Zelllinien abhängen. Festzuhalten bleibt jedoch, dass gemäß der vorliegenden Arbeit Cisplatin in therapeutischen Konzentrationen zu einer Reduktion statt zu einer Zunahme kovalenter Änderungen der Histone führte.

8. Literaturverzeichnis

Ahn SH, Diaz RL, Grunstein M, Allis CD (2006). Histone H2B deacetylation at lysine 11 is required for yeast apoptosis induced by phosphorylation of H2B at serine 10. *Mol Cell*; 24(2): 211-20

Attwood JT, Yung RL, Richardson BC (2002). DNA methylation and the regulation of gene transcription. *Cell Mol Life Sci*; 59: 241-257

Becker PB, Horz W (2002). ATP-dependent nucleosome remodeling. *Annu Rev Biochem*; 71: 247-273

Biel M, Wascholowski V, Giannis A (2005). Epigenetics – an epicenter of gene regulation: histones and histone-modifying enzymes. *Angew Chem Int Ed Engl*; 44: 3186-3216

Bird AP (1986). CpG-rich islands and the function of DNA methylation. *Nature*; 321: 209-213

Bishop JM (1983a). Oncogenes and proto-oncogenes. *Hosp Pract (OffEd)*; 18(8): 67-74

Bishop Jm (1983b). Cellular oncogenes and retroviruses. *Annu Revi Biochem*; 52: 301-354

Blagosklonny MV, Pardee AB (2002). The restriction point of the cell cycle. *Cell Cycle*; 1: 103-110

Bowman RV, Yang IA, Semmler AB, Fong KM (2006). Epigenetics of lung cancer. *Respirology*; 11(4): 355-65

Cairns BR (2005). Chromatin remodeling complexes: strength in diversity, precision through specialization. *Curr Opin Genet Dev*; 15: 185-90

Camporeale G, Shubert EE, Sarath G, Cerny R, Zempleni J (2004). K8 and K12 are biotinylated in human histone H4. *Eur J Biochem*; 271(11): 2257-63

Cheung WL, Ajiro K, Samejima K, Kloc M, Cheung P, Mizzen CA, Beeser A, Etkin LD, Chernoff J, Earnshaw WC, Allis CD (2003). Apoptotic phosphorylation of histone H2B is mediated by mammalian sterile twenty kinase. *Cell*; 113: 507-17

Classon M, Harlow E (2002). The retinoblastoma tumour suppressor in development and cancer. *Nature Reviews in Cancer*; 2: 910-917

Cloos PA, Christensen J, Agger K, Maiolica A, Rappsilber J, Antal T, Hansen KH, Helin K (2006). The putative oncogene GASC1 demethylates tri- and dimethylated lysine 9 on histone H3. *Nature*; 442(7100): 307-11

Davie JR (1998). Covalent modification of histones: expression from chromatin templates. *Curr Opin Genet Dev*; 8(2): 173-8

Eberharter A, Ferreira R, Becker P (2005). Dynamic chromatin: concerted nucleosome remodelling and acetylation. *Biol Chem*; 386(8): 745-51

Felsenfeld G, Groudine M (2003). Controlling the double helix. *Nature* 421, 448-53

Fernandez-Capetillo O, Allis CD, Nussenzweig A (2004). Phosphorylation of histone H2B at DNA double-strand breaks. *J Exp Med*; 199(12): 1671-7

Forneris F, Binda C, Vanoni MA, Battagliolo E, Mattevi A (2005). Human histone demethylase LSD1 reads the histone code. *J Biol Chem*; 280(50): 41360-5

Go RS, Adjei AA (1999). Review of the comparative pharmacology and clinical activity of cisplatin and carboplatin. *J Clin Oncol*; 17 (1):409-22

Golderer G, Grobner P (1991). ADP-ribosylation of core histones and their acetylated subspecies. *Biochem J*; 277 (Pt 3): 607-610

Goodwin EC, DiMaio D (2000). Repression of human papillomavirus oncogenes in HeLa cervical carcinoma cells causes the orderly reactivation of dormant tumor suppressor pathways. *Proc Natl Acad Sci USA*; 97(23): 12513-8

Grozinger CM, Schreiber SL (2002). Deacetylase enzymes: biological functions and the use of small-molecule inhibitors. *Chem Biol*; 9(1): 3-16

Gu W, Luo J, Brooks CL, Nikolaev AY, Li M (2004). Dynamics of the p53 acetylation pathway. *Novartis Found Symp*; 259: 197-205

Hambley TW, Berners-Price SJ, Davies MS, Diakos CI, Er HM, Fenton RR, Ling EC, Rezler EM (1998). Steric Determinants of Pt/DNA Interactions and Anticancer Activity. *Met Based Drugs*; 5(4): 197-206

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

Hans F, Dimitrov S (2001). Histone H3 phosphorylation and cell division. *Oncogene*; 20: 3021-3027

He H, Lehming N (2003). Global effects of histone modifications. *Brief Funct Genomic Proteomic*; 2(3): 234-43

Hong L, Schroth GP, Matthews HR, Yau P, Bradbury EM (1993). Studies of the DNA binding properties of histone H4 amino terminus. Thermal denaturation studies reveal that acetylation markedly reduces the binding constant of the H4 "tail" to DNA. *J Biol Chem*; 268: 305-314

van der Horst A, Tertoolen LG, de Vries-Smits LM, Frye RA, Medema RH, Burgering BM (2004). FOXO4 is acetylated upon peroxide stress and deacetylated by the longevity protein hSir2 (SIRT1). *J Biol Chem*; 279: 28873-9

Jenuwein T, Allis CD (2001). Translating the histone code. *Science*; 293: 1074-1080

Jörres RA, Heidinger M, Kronseder A, Stief J, Bergner A, Nowak D, Huber RM (2007). Single and combined effects of cisplatin, sodium butyrate and sirtinol on covalent histone modifications in human cell lines. European Respiratory Society, Annual Congress 2007, Stockholm, P956; *European Respiratory Journal*; 30 (Suppl 51)

Jones PA, Baylin SB (2002). The fundamental role of epigenetic events in cancer. *Nat Rev Genet*; 3: 415-428

Klose RJ, Yamane K, Bae Y, Zhang D, Erdjument-Bromage H, Tempst P, Wong J, Zhang Y (2006). The transcriptional repressor JHDM3A demethylates trimethyl histone H3 lysine 9 and lysine 36. *Nature*; 442(7100): 312-6

Knudson A (1971). Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA*; 68(4): 820-3

Langley E, Pearson M, Faretta M, Bauer UM, Frye RA, Minucci S, Pelicci PG, Kouzarides T (2002). Human SIR2 deacetylates p53 and antagonizes PML/p53-induced cellular senescence. *EMBO J*; 21: 2383-96

Lau JC, Hanel ML, Wevrick R (2004). Tissue-specific and imprinted epigenetic modifications of the human NDN gene. *Nucleic Acids Res*; 32(11): 3376-82

Lee DY, Hayes JJ, Pruss D, Wolffe AP (1993). A positive role for histone acetylation in transcription factor access to nucleosomal DNA. *Cell*; 72: 73-84

Lee MG, Wynder C, Bochar DA, Hakimi MA, Cooch N, Shiekhattar R (2006). Functional interplay between histone demethylase and deacetylase enzymes. *Mol Cell Biol*; 26: 6395-6402

Lodish H, Berk A, Matsudaira P, Kaiser CA, Krieger M, Scott MP, Zipursky SL, Darnell J (2004). Molecular Cell Biology. Fifth Edition. W. H. Freeman and Company

Lyko F, Brown R (2005). DNA methyltransferase inhibitors and the development of epigenetic cancer therapies. *J Natl Cancer Inst*; 97(20): 1498-506

Malumbres M, Carnero A (2003). Cell cycle deregulation: a common motif in cancer. *Progress in Cell Cycle research*; 5: 5-18

Mansouri A, Ridgway LD, Korapati AL, Zhang Q, Tian L, Wang Y, Siddik ZH, Mills GB, Claret FX (2003). Sustained activation of JNK/p38 MAPK pathway in response to cisplatin leads to Fas ligand induction and cell death in ovarian carcinoma cells. *J Biol Chem*; 278: 19245-56

Marks PA, Richon VM, Rifkind RA (2000). Histone Deacetylase Inhibitors: Inducers of Differentiation or Apoptosis of Transformed Cells. *JNCI Cancer Spectrum*; 92: 1210-1216

Marks PA, Miller T, Richon VM (2003). Histone deacetylases. *Curr Opin Pharmacol*; 3: 344-51

Marmorstein R (2004). Structure and chemistry of the Sir2 family of NAD⁺-dependent histone/protein deacetylases. *Biochem Soc Trans*; 32 (Pt 6): 904-9

Marmorstein R, Roth SY (2001). Histone acetyltransferases: funktion, structure and catalysis. *Curr Opin Genet Dev*; 11: 155-161

Martin M (2001). Platinum compounds in the treatment of advanced breast cancer. *Clin Breast Cancer*; 2 (3): 190-208

Matsushita N, Takami Y, Kimura M, Tachiiri S, Ishiai M, Nakayama T, Takata M (2005). Role of NAD-dependent deacetylases SIRT1 and SIRT2 in radiation and cisplatin-induced cell death in vertebrate cells. *Genes Cells*; 10: 321-32

Mizzen CA, Yang XJ, Kokubo T, Brownell JE, Bannister AJ, Owen-Hughes T, Workman J, Wang L, Berger SL, Kouzarides T, Nakatani Y, Allis CD (1996). The TAF(II)250 subunit of TFIID has histone acetyltransferase activity. *Cell*; 87: 1261-1270.

Motta MC, Divecha N, Lemieux M, Kamel C, Chen D, Gu W, Bultsma Y, McBurney M, Guarente L (2004). Mammalian SIRT1 represses forkhead transcription factors. *Cell*; 116: 551-63

Nathan D, Sterner DE, Berger SL (2003). Histone modifications: Now summoning sumoylation. *Proc Natl Acad Sci USA*; 100(23): 13118-20

Nowak SJ, **Corces** VG (2004). Phosphorylation of histone H3: a balancing act between chromosome condensation and transcriptional activation. *Trends Genet*; 20: 214-20

Ogryzko VV, Schiltz RL, Russanova V, Howard BH, Nakatani Y (1996). The transcriptional coactivators p300 and CBP are histone acetyltransferases. *Cell*; 87: 953-9

Ogryzko VV (2001). Mammalian histone acetyltransferases and their complexes. *Cell Mol Life Sci*; 58: 683-92

Oren M (2003). Decision making by p53: life, death and cancer. *Cell Death and Differentiation*; 10: 431-442

Ozaki K, Kishikawa F, Tanaka M, Sakamoto T, Tanimura S, Kohno M (2008). Histone deacetylase inhibitors enhance the chemosensitivity of tumor cells with cross-resistance to a wide range of DNA-damaging drugs. *Cancer Sci*; 99: 376-384

Peterson CL, **Laniel** MA (2004). Histones and histone modifications. *Curr Biol*; 14: R546-51

Pons D, de Vries FR, van den Elsen PJ, Heijmans BT, Quax PH, Jukema JW (2009). Epigenetic histone acetylation modifiers in vascular remodelling: new targets for therapy in cardiovascular disease. *Eur Heart J*; 30(3): 266-77

Prives C, Hall PA (1999). The p53 pathway. *Journal of Pathology*; 187: 112-126

Rada-Iglesias A, Enroth S, Ameer A, Koch CM, Clelland GK, Respuela-Alonso P, Wilcox S, Dovey OM, Ellis PD, Langford CF, Dunham I, Komorowski J, Wadelius C (2007). Butyrate mediates decrease of histone acetylation centered on transcription start sites and down-regulation of associated genes. *Genome Res*; 17: 708-719

Rikiishi H, Shinohara F, Sato T, Sato Y, Suzuki M, Echigo S (2007). Chemosensitization of oral squamous cell carcinoma cells to cisplatin by histone deacetylase inhibitor, suberoylanilide hydroxamic acid. *International journal of Oncology*; 30: 1181-1188

Robertson KD (2001). DNA methylation, methyltransferases, and cancer. *Oncogene*; 20(24): 3139-55

de Ruijter AJ, van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, van Kuilenburg AB (2003). Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J*; 370: 737-49

Sarg B, Helliger W, Talasz H, Koutzamani E, Lindner HH (2004). Histone H4 hyperacetylation precludes histone H4 lysine 20 trimethylation. *J Biol Chem*; 279: 53458-64

Sato T, Suzuki M, Sato Y, Echigo S, Rikiishi H (2006). Sequence-dependent interaction between cisplatin and histone deacetylase inhibitors in human oral squamous cell carcinoma cells. *International Journal of Oncology*; 28: 1233-1241

Sherr CJ (2000). Cancer cell cycles revisited. *Cancer Research*; 60: 3689-3695

Sims RJ, III, Nishioka K, Reinberg D (2003). Histone lysine methylation: a signature for chromatin function. *Trends Genet*; 19: 629-639

Tallen G, Mock C, Gangopadhyay SB, Kangarloo B, Krebs B, Wolff JE (2000). Overcoming cisplatin resistance: design of novel hydrophobic platinum compounds. *Anticancer Res*; 20(1A): 445-9

Temple MD, McFadyen D, Holmes RJ, Denny WA, Murray V (2000). Interaction of cisplatin an DNA-Targeted 9-Aminoacridine platinum complexes with DNA. *Biochemistry*; 39: 5593-5599

Thomas M, Baumann M, Deppermann M, Freitag L, Gatzemeier U, Huber R, Passlick B, Serke M, Ukena D (2002). Recommendations on the Therapy of Bronchial Carcinomas. *Pneumologie*; 56: 113-131

Trievel RC (2004). Structure and function of histone methyltransferases. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr*; 14(3): 147-69

Vaziri H, Dessain SK, Ng Eaton E, Imai SI, Frye RA, Pandita TK, Guarente L, Weinberg RA (2001). hSIR2 (SIRT1) functions as an NAD-dependent p53 deacetylase. *Cell*; 107: 149-159

Wang S, Yan-Neale Y, Fischer D, Zeremski M, Cai R, Zhu J, Asselbergs F, Hampton G, Cohen D (2003). Histone deacetylase 1 represses the small GTPase RhoB expression in human nonsmall lung carcinoma cell line. *Oncogene*; 22(40): 6204-13

Wang D, Lippard SJ (2004). Cisplatin-induced post-translational modification of histones H3 and H4. *J Biol Chem*; 279: 20622-5

Wang D, Lippard SJ (2005). Cellular processing of platinum anticancer drugs. *Nat Rev Drug Discov*; 4:307-20

Wesierska-Gadek J, Schloffer D, Kotala V, Horky M (2002). Escape of p53 protein from E6-mediated degradation in HeLa cells after cisplatin therapy. *Int J Cancer*; 101, 128-136

Whetstine JR, Nottke A, Lan F, Huarte M, Smolikov S, Chen Z, Spooner E, Li E, Zhang G, Colaiacovo M, Shi Y (2006). Reversal of histone lysine trimethylation by the JMJD2 family of histone demethylases. *Cell*; 125: 467-481

Yang D, **Wang** AH (1996). Structural studies of interaction between anticancer platinum drugs and DNA. *Prog Biophys Mol Biol*; 66(1): 81-111

Zhang K, Williams KE, Huang L, Yau P, Siino JS, Bradbury EM, Jones PR, Minch MJ, Burlingame AL (2002). Histone acetylation and deacetylation: identification of acetylation and methylation sites of HeLa histone H4 by mass spectrometry. *Mol Cell Proteomics*; 1: 500-8

Zhang Y (2003). Transcriptional regulation by histone ubiquitination and deubiquitination. *Genes Dev*; 17(22): 2733-40

Zhang Y, **Reinberg** D (2001). Transcription regulation by histone methylation: interplay between different covalent modifications of the core histone tails. *Genes Dev*; 15:2343-60

9. Abbildungsverzeichnis

Abb. 1:	Kovalente Bindung von Cisplatin an das N ⁷ -Atom des Purins von Guanin und Bildung von 1,2- oder 1,3-intrastrand crosslinks und Interstrand crosslinks [Wang & Lippard, 2005].....	14
Abb. 2:	Phasen des Zellzyklus [Lodish et al., 2004].....	18
Abb. 3:	Verpackungsstufen der DNA [Felsenfeld & Groudine, 2003].....	23
Abb. 4:	Acetylierung und Deacetylierung von Histonen und Chromatinstruktur [Pons <i>et al.</i> , 2009].....	25
Abb. 5:	Gel mit aufgetrennten Proteinbanden nach abgelaufener Gelelektrophorese.....	40
Abb. 6:	Nitrocellulose-Membran mit übertragenen Proteinbanden.....	42
Abb. 7:	Entwickelte Röntgenbilder von detektierten Western Blots.....	46
Abb. 8a:	Gesamt-Acetylierung H3 (EPLC, n=14).....	54
Abb. 8b:	Gesamt-Acetylierung H4 (EPLC, n=14).....	54
Abb. 8c:	Phosphorylierung H2B Ser14 (EPLC, n=14).....	55
Abb. 8d:	Phosphorylierung H3 Ser10 (EPLC, n=14).....	55
Abb. 8e:	Trimethylierung H3 Lys9 (EPLC, n=14).....	56
Abb. 9a:	Gesamt-Acetylierung H3 (EPLC-NaBu).....	58
Abb. 9b:	Gesamt-Acetylierung H4 (EPLC-NaBu).....	58
Abb. 9c:	Phosphorylierung H2B Ser14 (EPLC-NaBu).....	59
Abb. 9d:	Phosphorylierung H3 Ser10 (EPLC-NaBu).....	59
Abb. 9e:	Trimethylierung H3 Lys9 (EPLC-NaBu).....	60
Abb. 10a:	Gesamt-Acetylierung H3 (EPLC-Sirtinol).....	62
Abb. 10b:	Gesamt-Acetylierung H4 (EPLC-Sirtinol).....	62
Abb. 10c:	Phosphorylierung H2B Ser14 (EPLC-Sirtinol).....	63
Abb. 10d:	Phosphorylierung H3 Ser10 (EPLC-Sirtinol).....	63
Abb. 10e:	Trimethylierung H3 Lys9 (EPLC-Sirtinol).....	64
Abb. 11a:	Gesamt-Acetylierung H3 (Beas-2B).....	66
Abb. 11b:	Gesamt-Acetylierung H4 (Beas-2B).....	66
Abb. 11c:	Phosphorylierung H2B Ser14 (Beas-2B).....	67
Abb. 11d:	Phosphorylierung H3 Ser10 (Beas-2B).....	67

Abb. 11e:	Trimethylierung H3 Lys9 (Beas-2B).....	68
Abb. 12a:	Gesamt-Acetylierung H3 (HCC).....	70
Abb. 12b:	Gesamt-Acetylierung H4 (HCC).....	70
Abb. 12c:	Phosphorylierung H2B Ser14 (HCC).....	71
Abb. 12d:	Phosphorylierung H3 Ser10 (HCC).....	71
Abb. 12e:	Trimethylierung H3 Lys9 (HCC).....	72
Abb. 13a:	EPLC Zellzählung (n=14).....	74
Abb. 13b:	EPLC-NaBu Zellzählung.....	75
Abb. 13c:	EPLC-Sirtinol Zellzählung.....	76
Abb. 13d:	Beas-2B Zellzählung.....	76
Abb. 13e:	HCC Zellzählung.....	77

10. Tabellenverzeichnis

Tab. 1:	TNM-Klassifikation des Bronchialkarzinoms (UICC, 1997).....	9
Tab. 2:	Zuordnung des Bronchialkarzinoms nach TNM-Deskriptoren zum Internationalen Staging-System (UICC, 1997).....	11
Tab. 3:	Bezeichnung, Herkunft und Bezugsquelle der verwendeten Zelllinien.....	31
Tab. 4:	Expositionsschema.....	34
Tab. 5:	Geometrische Mittelwerte und Standardfehler der untersuchten Histonmodifikationen bei Inkubation der EPLC-Zelllinie mit Cisplatin (n=14).....	57
Tab. 6:	Geometrische Mittelwerte und Standardfehler der untersuchten Histonmodifikationen bei Inkubation der EPLC-Zelllinie mit Cisplatin und/oder Natriumbutyrat.....	61
Tab. 7:	Geometrische Mittelwerte und Standardfehler der untersuchten Histonmodifikationen bei Inkubation der EPLC-Zelllinie mit Cisplatin und/oder Sirtinol.....	65
Tab. 8:	Geometrische Mittelwerte und Standardfehler der untersuchten Histonmodifikationen bei Inkubation der Beas-2B-Zelllinie mit Cisplatin und/oder Natriumbutyrat.....	69
Tab. 9:	Geometrische Mittelwerte und Standardfehler der untersuchten Histonmodifikationen bei Inkubation der HCC-Zelllinie mit Cisplatin und/oder Natriumbutyrat.....	73
Tab. 10:	Geometrische Mittelwerte der Zellzählung nach Inkubation der untersuchten Zelllinien mit Cisplatin und/oder Natriumbutyrat bzw. Sirtinol.....	78
Tab. 11:	Mittlere prozentuale Abnahme der Zellzahl nach Inkubation der untersuchten Zelllinien mit Cisplatin und/oder Natriumbutyrat bzw. Sirtinol.....	79
Tab. 12:	Zusammenfassende Darstellung der Ergebnisse der Histonmodifikationen in den unterschiedlichen Zelllinien.....	81

A.1. Curriculum vitae

Name: Kastner, geb. Heidinger

Vorname: Mechthild

Geburtsdatum: 14.02.1980

Geburtsort: Zürich, Schweiz

Schulbildung:

1990 – 1995 Gymnasium Gernsbach

1995 – 1999 Markgraf-Ludwig-Gymnasium Baden-Baden

21.06.1999 Allgemeine Hochschulreife

Hochschulbildung:

01.04.2000 Beginn des Studiums der Zahnmedizin an der
Ludwig-Maximilians-Universität München

23.03.2001 Naturwissenschaftliche zahnärztliche Vorprüfung

21.02.2003 Zahnärztliche Vorprüfung

30.01.2006 Zahnärztliche Prüfung

15.03.2006 Approbation als Zahnärztin

Berufliche Tätigkeit:

11/2006-05/2007 Assistenz Zahnärztin in niedergelassener Zahnarztpraxis in
Grafing bei München

seit 01.06.2007 Assistenz Zahnärztin in niedergelassener Zahnarztpraxis in
München

A.2. Danksagung

Ich danke Herrn Prof. Dr. med. D. Nowak, Direktor des Instituts für Arbeits-, Sozial- und Umweltmedizin der Medizinischen Klinik Innenstadt der LMU für die Bereitstellung des Themas und die herzliche Aufnahme und Betreuung als Doktorandin in seinem Institut.

Ebenso gilt mein Dank Herrn Prof. Dr. med. R. M. Huber, Leiter der Pneumologie der Medizinischen Klinik Innenstadt der LMU für die Überlassung des Themas und die freundliche Aufnahme und Betreuung meiner Arbeit in seiner Abteilung.

Mein ganz besonderer Dank gilt Herrn PD Dr. rer. nat. Rudolf A. Jörres für seine großartige Betreuung während der gesamten Zeit. Ohne seine fachliche und menschliche Unterstützung wäre diese Arbeit nicht zustande gekommen.

Frau Angelika Kronseder, CTA, möchte ich für ihre fachliche Anleitung im labortechnischen Teil der Arbeit und die freundschaftliche Aufnahme in ihr Reich während der Laboranalysen danken.

Desweiteren Dank an Herrn Dr. Fernando Gamarra und Frau Dr. Jutta Stief für die Einführung und Hilfe bei der Kultivierung von Zelllinien.

Dank geht auch an Herrn Dr. Stefan Karrasch für Durchsicht, Verbesserung und Korrektur dieser Arbeit.

Meiner Mutter, die mir mein Studium überhaupt erst ermöglicht hat, für ihre unermüdliche Unterstützung auf meinem bisherigen Lebensweg.

Dir, Georg, für Deine Geduld und Liebe in den letzten Jahren und für das Lächeln, das Du mir auf die Lippen zauberst. Ich freue mich sehr auf unsere gemeinsame Zukunft.

A.3. Eigenständigkeitserklärung

Hiermit versichere ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbstständig verfasst habe und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe. Die Stellen, die anderen Werken dem Wortlaut oder dem Sinn nach entnommen wurden, habe ich durch Angabe der Quelle als Entlehnung kenntlich gemacht.

München, 28.10.2009 _____