Aus der Medizinischen Klinik und Poliklinik II der Universität Würzburg Direktor: Professor Dr. med. H. Einsele

Einfluss und Wirkung des HDAC-Inhibitors LBH589 auf Proliferation und Differenzierung der kolorektalen Karzinomzelllinien SW480 und SW620

> Inaugural-Dissertation zur Erlangung der Doktorwürde der Medizinischen Fakultät der Julius-Maximilians-Universität Würzburg vorgelegt von David Michael Eller aus Kraisdorf

> > Würzburg, April 2011

Referent: Priv.-Doz. Dr. med. R. Melcher

Koreferent: Professor Dr. med. C.-T. Germer

Dekan: Professor Dr. med. M. Frosch

Tag der mündlichen Prüfung: 19.03.2012

Der Promovend ist Arzt.

MEINEN ELTERN

Inhaltsverzeichnis

1 Einleitung1
1.1 Das kolorektale Karzinom: Epidemiologie und Risikofaktoren1
1.2 Grundlagen der Karzinogenese und Adenom-Karzinomsequenz nach Vogelstein 1
1.3 Histondeacetylasen (HDAC) als Zielstruktur antineoplastischer Therapie4
1.3.1 Histone und ihre Bedeutung für die Genexpression4
1.3.2 Gestörte HDAC-Aktivität und maligne Transformation
1.3.3 HDAC-Inhibitoren und deren antineoplastische Aktivität6
1.3.4 HDAC-Inhibitoren in der Anti-Tumortherapie des kolorektalen Karzinoms7
1.3.5 Bisheriger Stellenwert von LBH589 in der Anti-Tumor-Therapie8
2 Aufgabenstellung und Zielsetzung10
3 Material und Methoden11
3.1 Material11
3.1.1 Zellkulturen, Kulturmedien, Geräte, Software, Chemikalien,
Verbrauchsmaterial11
3.2 Methoden14
3.2.1 Untersuchung der Zellproliferation14
3.2.2 Untersuchung der Zelldifferenzierung15
3.2.3 Statistische Auswertung16
4 Ergebnisse
4.1 Einfluss von LBH589 auf die Proliferation18
4.1.1 Untersuchungen an der Zelllinie SW48018
4.1.2 Untersuchungen an der Zelllinie SW62021
4.2 Einfluss von LBH589 auf die Differenzierung24
4.2.1 Untersuchungen an der Zelllinie SW48024
4.2.2 Untersuchungen an der Zelllinie SW62027
5 Diskussion
5.1 LBH589 und Zellproliferation
5.2 LBH589 und Zelldifferenzierung
5.3 HDAC-Inhibitoren und LBH589 in der Anti-Tumortherapie und speziell in der
Behandlung des kolorektalen Karzinoms34

5.4 Einordnung der Ergebnisse dieser Arbeit	
6 Zusammenfassung	
7 Literaturverzeichnis	

1 Einleitung

1.1 Das kolorektale Karzinom: Epidemiologie und Risikofaktoren

Das kolorektale Karzinom stellt eine der häufigsten malignen Tumorerkrankungen der westlichen Industrienationen dar (Ferlay et al., 2002). Beim männlichen und beim weiblichen Geschlecht ist es das Malignom mit der zweithöchsten Inzidenz in Deutschland (Loss et al., 2006). Ebenso an zweiter Stelle liegt es in der Statistik malignomabhängiger Mortalität. Nach Angaben des Robert-Koch-Instituts erkrankten im Jahr 2004 ca. 73 000 Menschen am kolorektalen Karzinom. Jährlich versterben etwa 30 000 Menschen an kolorektalen Malignomen. Das Lebenszeitrisiko für das kolorektale Karzinom beträgt ca. 6 %.

Ca. 90 % aller kolorektalen Karzinome entstehen sporadisch, meist über Adenomvorstufen. Eine genetische familiäre Prädisposition liegt in ca. 10 % der Fälle vor. Dabei handelt es sich u. a. um Mutationen in wichtigen Genen der Zellregulation wie z. B. dem APC-Gen bei der Familiären Adenomatösen Polyposis (FAP). Auch DNA-Reparatur-Enzyme können betroffen sein wie beim Hereditären Nicht-Polypösen Kolon-Karzinom (HNPCC).

Als Risikofaktoren spielen sowohl exogene als auch endogene Faktoren eine Rolle. So nimmt das Risiko zu erkranken mit dem Alter zu. Ebenso können chronisch entzündliche Darmerkrankungen (z. B. Colitis ulcerosa) das Risiko erhöhen. Besondere Bedeutung kommt exogenen Faktoren wie fettreicher, ballaststoffarmer Ernährung, sowie Alkohol- und Nikotinabusus zu (Hill et al., 2006). Alle diese Faktoren verlängern die Transitzeit des Chymus. Es wird angenommen, dass dadurch der Kontakt potentiell karzinogener Nahrungsbestandteile mit der Darmschleimhaut intensiviert wird. Die Erkenntnis, dass eine faserreiche Kost und sportliche Betätigung und die damit verbundene Beschleunigung der Transitzeit einen protektiven Einfluss nehmen, bestärkt diese Vermutung (Scheppach et al., 1991).

1.2 Grundlagen der Karzinogenese und Adenom-Karzinomsequenz nach Vogelstein

Die gesunde Zelle der Kolonschleimhaut befindet sich unter der Kontrolle und den Einflüssen vieler verschiedener Gene und Faktoren. Dabei lassen sich grundsätzlich proliferationsfördernde Faktoren, die sogenannten Proto-Onkogene, und limitierende Einflüsse, die sogenannten Tumorsuppressorgene und Mutatorgene, unterscheiden. Diese Genklassen werden auch als "caretaker"- und "gatekeeper"-Gene bezeichnet (Kinzler et al., 1997). Beide Systeme befinden sich in der gesunden Zelle im Gleichgewicht.

Proto-Onkogene fördern Proliferation und Wachstum in gesunden Zellen. Durch Mutation veränderte Proto-Onkogene werden dann auch als Onkogene bezeichnet. Von Bedeutung ist, dass bereits die Fehlregulation eines Allels pathologisches Ausmaß erreicht. Das erste Proto-Onkogen, das mit der Entstehung des kolorektalen Karzinoms in Verbindung gebracht werden konnte, ist das "k-ras"-Onkogen (Vogelstein et. al., 1988). Es gehört zur Familie der G-Proteine und ist auf Chromosom 12 lokalisiert. Mutationen führen zu einem ständigen Wachstumsreiz und werden sowohl in ca. 50 % der großen polypösen Adenome als auch in ca. 50 % der kolorektalen Karzinome gefunden.

Protektiven Charakter besitzen hingegen Tumorsuppressorgene, die die Integrität des Genoms sichern. Diese physiologischen Gegenspieler der Proto-Onkogene greifen regulierend in den Zellzyklus ein. So gehört u. a. die Reparatur von DNA-Schäden bzw. die Überführung der dysregulierten Zelle in die Apoptose (programmierter Zelltod) zu den sehr vielseitigen Aufgaben. Damit es zum Ausfall solcher Tumorsuppressorgene kommt, bedarf es allerdings des Ausfalls beider Allele. Als ein Beispiel, das beim kolorektalen Karzinom eine Rolle spielt, sei der Transkriptionsfaktor p53 genannt (Somasundaram, 2000). Genauso wie das APC-Gen, welches an der Regulation der Expression anderer Gene beteiligt ist (Su et al., 1993), bildet p53 sogenannte "Checkpoints" im Zellzyklus. Ein weiteres Tumorsuppressorgen ist das DCC-Gen, dessen Genprodukt ein membranständiges Adhäsionsmolekül darstellt, das eine Rolle bei der Apoptose-Induktion spielt (Cho und Fearon, 1995).

Zu den Tumorsuppressorgenen werden häufig auch Mutatorgene gezählt. Deren Aufgabe besteht in der korrekten Vervielfältigung der Erbinformation. Ausfälle führen hier zur fehlerhaften DNA-Reparatur. Dadurch resultieren erhöhte Mutationsraten in Form von z. B. Translokationen oder Doppelstrangbrüchen, was letztlich in einer fortschreitenden Entartung der Tumorzelle mündet. Beispiele sind hier die Reparaturenzyme hMSH 2 und hMLH1. Beide spielen eine Rolle beim Hereditären Nicht-Polypösen Kolon-Karzinom (HNPCC), wo sie in 80 - 90 % der Fälle ausgefallen sind. Die Adenom-Karzinomsequenz nach Fearon und Vogelstein (1990) stellt ein genetisches Mehrschrittmodell der Karzinogenese des sporadischen kolorektalen Karzinoms dar (Abbildung 1). Dabei wird der Verlauf der malignen Transformation der gesunden Darmschleimhaut über adenomatöse Vorstufen bis zum metastasierungsfähigen Karzinom in Zusammenhang mit der Mutation und der daraus resultierenden Aktivitätsänderung von u. a. bereits oben erwähnten Schlüsselgenen gesetzt. Entscheidende Bedeutung besitzt die Akkumulation von vier bis fünf genetischen Alterationen, weniger deren chronologische Abfolge.

Zunächst geht das normale Schleimhautepithel der Darmmukosa in ein hyperproliferatives Epithel über. Mit dieser Wachstumsentgleisung wird der Funktionsverlust ("loss of function") des APC-Gens assoziiert.

Relativ früh kommt es auch zum Verlust von Methylgruppen und damit zur Hypomethylierung der DNA. Fearon postulierte 1990 eine damit verbundene Inhibition der Chromosomenkondensation. Die daraus resultierende chromosomale Instabilität stellt einen prädisponierenden Faktor für den Verlust von Tumorsuppressorgenallelen dar.

Es folgt im weiteren Verlauf die dauerhafte Aktivierung des k-ras-Onkogens durch Mutation ("gain of function").

Spätere Ereignisse sind der Funktionsverlust der Tumorsuppressorgene DCC (deleted in colon cancer) sowie des p53. DCC-Mutationen resultieren in einer Schwächung des Zellzusammenhaltes und sind in ca. 70 % der kolorektalen Karzinome vorzufinden. Der häufigste (ca. 80 %) gefundene Ausfall ist der des p53-Genprodukts. Bedeutung erlangt er v. a. durch die vielfältigen Aufgaben des p53, wie z. B. Hemmung der DNA-Replikation und des Zellzyklus oder Apoptoseinduktion bei bestimmten Stresssignalen der Zelle. Daher wird p53 auch als "Wächter des Genoms" bezeichnet (Vousden, 2000). Die zunehmende genetische Instabilität führt zu weiteren genetischen Veränderungen, wie dem Verlust der Kontaktinhibition der Zellen. Mit Hilfe von Metalloproteinasen gelingt es schließlich dem Tumor invasiv-destruierend zu wachsen und damit Anschluss an das Lymph- und Blutgefäßsystem zu erhalten. Dadurch besitzt der Tumor das Potential Metastasen zu bilden. Dazu bedarf es aber ebenfalls noch der Fähigkeit, selbst Faktoren der Angioneogenese zu bilden, um eine unabhängige Versorgung von Tumor, aber eben auch der Metastase, zu gewährleisten.



Abbildung 1: Adenom-Karzinom-Sequenz. Modifiziert nach Fearon und Vogelstein 1990.

1.3 Histondeacetylasen (HDAC) als Zielstruktur antineoplastischer Therapie

1.3.1 Histone und ihre Bedeutung für die Genexpression

Histone sind die häufigsten mit eukaryontischer DNA assoziierten Proteine. Dabei handelt es sich um kleine basische Moleküle mit vielen positiv geladenen Aminosäuren. Dadurch wird eine sehr gute Interaktion mit den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA gewährleistet. Das Ziel dieser Interaktion besteht darin, die DNA in Form von Chromatin im Zellkern zu verpacken. Chromatin ist ein makromolekularer Komplex, der aus DNA, Histonen und Nicht-Histon-Proteinen besteht. Jedoch muss die DNA nicht nur kondensiert im Zellkern untergebracht werden, sondern es müssen auch essentielle Vorgänge wie Transkription oder Replikation ablaufen können.

Daher kann das Chromatin in zwei unterschiedlichen Formen vorliegen. Einerseits als eher dicht gepacktes, kondensiertes Heterochromatin, dem man allgemein eine geringe transkriptionelle Aktivität zuschreibt, andererseits das eher locker gepackte Euchromatin mit eher hoher transkriptioneller Aktivität (Jenuwein und Allis, 2001). Entscheidender Faktor scheint dabei die sterische Anordnung des Chromatins zu sein. In der kondensierten Form ist der Zugang für Initiator- und Transkriptionsfaktoren an spezifische DNA-Sequenzen erschwert und erlaubt daher nicht die Ausführung essentieller Schritte zum Ablesen der DNA. Es gibt fünf Haupttypen von Histonen: Histon 2A (H2A), Histon 2B (H2B), Histon 3 (H3), Histon 4 (H4) und Histon 1 (H1). Im Organismus existieren sehr viele Histonvarianten mit spezialisierten Funktionen, wie z. B. der Detektion von DNA-Strangbrüchen oder Aktivierung/Silencing von Chromatin. H2A und H2B, sowie H3 und H4 bilden jeweils Dimere. Vier solcher Dimere bilden ein Oktamer, um das sich dann letztlich 146 bp (Basenpaare) DNA winden. Dieses Gebilde wird als Nukleosom bezeichnet. Die DNA zwischen diesen Nukleosomen wird linker-DNA genannt. Histone besitzen au-Berdem immer ein C- und N-terminales Ende, sogenannten Histon-"tails". Diese Tails sowie H1 werden für die Verpackung in die 30 nm Fiber benötigt. An der weiteren Verpackung in übergeordnete Chromatinstrukturen sind noch zusätzliche Chromatinassoziierte Proteine beteiligt, z. B. HMG-Proteine oder das HP-1 (Heterochromatin-Protein 1). Modifikationen der Histontails erlauben es, die Struktur des Chromatins zu reorganisieren (Abbildung 2). Damit steht der Zelle ein dynamischer Regulationsprozess der Transkription zur Verfügung. Diese Modifikationen entstehen posttranslational und umfassen Phosphorylierungs-, Methylierungs- und Acetylierungsprozesse, die als Histon-Code bezeichnet wurden (Wu und Grunstein, 2000; Jenuwein und Allis, 2001).



Π

Ι

Abbildung 2: Posttranslationale Modifikation an Histonproteinen. Acetylierung (Ac), Methylierung (Me) und Phosphorylierung (P) verändern die Nukleosomstruktur. **I:** Histondeacetylierung und DNA-Methylierung sind verbunden mit transkriptioneller Repression und kompakter Chromatinstruktur. **II:** Histonacetylierung und DNA-Demethylierung sind verbunden mit transkriptioneller Aktivierung und gelockerter Chromatinstruktur. HDAC (Histondeacetylase), HAT (Histonacetyltransferase)

Mit dem Ausmaß der Acetylierung (an Lysinen) kann die Zelle kurzfristig die Expression spezifischer Gene regulieren und damit auf Signale von bestimmten Botenstoffen reagieren. Dabei handelt es sich um ein dynamisches Gleichgewicht aus Acetylierung und Deacetylierung von Histonen durch zwei kompetitive Enzymfamilien: Histonacetyltransferasen (HATs) und Histondeacetylasen (HDACs) (Acharya et al., 2005). Hypoacetylierungen führen zu einer starken internucleosomalen Interaktion und einer dichten Chromatinstruktur. Hyperacetylierungen dagegen schwächen diese Bindung und ermöglichen damit den Zugang von Transkriptionsfaktoren durch Bildung einer aktiven, offenen Chromatinstruktur.

1.3.2 Gestörte HDAC-Aktivität und maligne Transformation

Ein fehlerhaftes Acetylierungs-/Deacetylierungsmuster spielt in der malignen Transformation nachweislich eine Rolle. Genmutationen, die zu einer Überaktivierung von HDACs, einem Funktionsverlust von HATs oder deren fehlerhaften Aktivierung an bestimmten Zielstrukturen wie z. B. Promotoren führen, können einen entscheidenden Beitrag zur malignen Entartung leisten (Jacobson und Pillus, 1999; Kouzandes, 1999; Esteller und Herman, 2002).

Bereits gut untersucht ist dieser Vorgang in der Onkogenese der akuten promyeloischen Leukämie (APL) (He et al., 1998; Lin et al., 1998; Grignani et al., 1998). Chromosomale Translokationen führen zur Bildung von onkogenen Retinolsäure-Rezeptor-Fusionsproteinen. Dadurch kommt es zur fehlerhaften Aktivierung von HDAC-Komplexen, welche die weitere Differenzierung der myeloischen Reihe unterbinden. Der Zusatz von HDAC-Inhibitoren hilft diese Differenzierungsblockade zu durchbrechen.

Dieses Modell lässt sich auch auf die Entstehung solider Tumore übertragen. Ein gestörtes Verhältnis zwischen HAT- und HDAC-Aktivität spielt dabei eine Rolle in der malignen Entartung und der Progression (Minucci und Pelicci, 2006). Beim kolorektalen Karzinom scheint der Verlust des APC-Tumorsuppressorgens in Zusammenhang mit einer erhöhten HDAC-Aktivität zu stehen (Zhu et al., 2004).

1.3.3 HDAC-Inhibitoren und deren antineoplastische Aktivität

HDAC-Inhibitoren sind inzwischen ein vielversprechender Ansatz in der Therapie maligner Erkrankungen. Dabei zeigt der Zusammenhang von maligner Entartung und einer Fehlregulation der Genexpression durch fehlerhafte HDACs neue Handlungsmöglichkeiten und Therapieoptionen auf.

HDAC-Inhibitoren zeichnen sich dadurch aus, dass sie in der Lage sind, an HDACs zu binden und sie damit in ihrer Aktivität der Histondeacetylierung zu hemmen. Dabei handelt es sich um eine sehr heterogene Gruppe, die biochemisch in folgende Untergruppen unterteilt werden kann: Ketone, Hydroxaminsäuren, cyclische Tetrapeptide, kurzkettige Fettsäuren und synthetische Benzamide.

Die antineoplastische Aktivität der HDAC-Inhibitoren wird auf die Fähigkeit Differenzierungsmechanismen in Gang zu setzen, stetige Zellproliferation zu inhibieren, sowie die Apoptose in maligne transformierten Zellen zu induzieren, zurückgeführt (Marks et al., 2000, Johnstone, 2002; Zhou et al., 2007). Des Weiteren werden eine Hemmung der Angiogenese (Kim et al., 2001) und die Aktivierung von Immunantworten (Maeda et al., 2000; Magner et al., 2000; Armeanu et al., 2005) als weitere Bestandteile der Tumorregression durch HDAC-Inhibitoren in vivo diskutiert.

Bereits nachgewiesen ist der Effekt von HDAC-Inhibitoren in Form von Proliferationshemmung und Differenzierungsinduktion bei verschiedenen Leukämien und soliden Tumoren (Marks et al., 2000; Weidle und Grossmann, 2000; Krämer et al., 2001; Marks et al., 2001), wobei maligne transformierte Zellen viel stärker als normale Zellen auf HDAC-Inhibitoren anzusprechen scheinen (Rosato und Grant, 2003; Insinga et al., 2005). Nach erfolgreichen präklinischen Studien in der Behandlung von Leukämien als auch solider Tumoren laufen inzwischen klinische Phase-I- und -II- Studien, in denen HDAC-Inhibitoren als Monosubstanz oder zusammen mit anderen Tumortherapeutika getestet werden (Acharya et al., 2005; Minucci und Pelicci, 2006; Rasheed et al., 2007).

1.3.4 HDAC-Inhibitoren in der Anti-Tumortherapie des kolorektalen Karzinoms

Auch in der Therapie des kolorektalen Karzinoms wurden in den letzten Jahren Anstrengungen unternommen, Fortschritte mit HDAC-Inhibitoren zu erzielen. So wurde in mehreren Studien das Expressionsprofil von HDACs in normalen Zellen des gesunden Kolons untersucht (Wilson et al., 2006; Nakagawa et al., 2007; Ishihama et al., 2007; Zhu et al., 2004). Das Vorkommen von HDACs überwiegend in den Krypten steht in Einklang mit der Rolle dieser Enzyme in der Aufrechterhaltung von Proliferation und dem Überleben von Zellen, sowie einer Hemmung der Differenzierung. Zusätzlich wurde auch das HDAC-Profil in Kolontumoren erforscht (Wilson et al., 2006; Nakagawa et al., 2007; Ishihama et al., 2007; Zhu et al., 2004; Huang et al., 2005). Dabei wird in den meisten Untersuchungen von einer verstärkten Expression von HDACs in Tumoren des Kolons berichtet. Unterstützt wird dies u. a. durch die Entdeckung, dass z. B. die Kolonkarzinomzelllinie SW480, die auch im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde, die HDAC3 sehr stark exprimiert (Spurling et al., 2008). Spurling et al. konnten in diesem Kontext auch eine Wachstumshemmung der Zellen der Linie SW480 nach Inhibition der HDAC3 nachweisen.

Schon seit Jahrzehnten als HDAC-Inhibitor bekannt ist die kurzkettige Fettsäure Butyrat (Riggs et al., 1977). Butyrat führte dabei zu einer Hyperacetylierung von Histonen und Nicht-Histon-Proteinen in Zellen des kolorektalen Karzinoms (Lührs et al., 2002) und zeigte Anti-Tumoreffekte in Form von Proliferationshemmung sowie Stimulierung von Differenzierung und Apoptose in Zellen des kolorektalen Karzinoms (Kim et al., 1980; Hague et al., 1993; Heerdt et al., 1994, Lührs et al., 2002). Dazu verhindert Butyrat die Aktivierung von NF-κB (Lührs et al., 2002) und resultiert in einer veränderten Genexpression (Menzel et al., 2002). Vielversprechende Ergebnisse ergaben beispielsweise auch die Untersuchungen mit Valproat, ebenfalls ein HDAC-Inhibitor, an Zellen des kolorektalen Karzinoms. Valproat vermochte Kolonkarzinomzellen im Wachstum zu hemmen und den programmierten Zelltod auszulösen. (Mologni et al., 2009).

1.3.5 Bisheriger Stellenwert von LBH589 in der Anti-Tumor-Therapie

Der HDAC-Inhibitor LBH589, ein Hydroxaminsäurederivat, ist ein potentieller Inhibitor aller HDAC-Enzyme in Tumoren und hat sein Potenzial in der Anti-Tumor-Therapie bereits in präklinischen Modellen und in klinischen Studien gezeigt (Atadja P, 2009). Dabei erhöht LBH589 den Acetylierungsstatus von Histon 3 (H3) und Histon 4 (H4) in Tumorzellen (Qian et al., 2006; Yu et al., 2007).

Am weitesten fortgeschritten und am häufigsten untersucht ist der Einfluss von LBH589 auf hämatologische Zelllinien. In Zellen des Multiplen Myeloms vermochte LBH589 die Apoptose zu induzieren und Einfluss auf über tausend Gene der Regulation von Zellzyklus und Zelltod zu nehmen (Maiso et al., 2006). Dabei verstärkte es zusätzlich die Wirkung von Therapeutika wie Bortezomib (Catley et al., 2006), Dexamethason oder Melphalan und wirkt mit diesen synergetisch (Maiso et al., 2006). Im Rahmen einer Phase-I-Studie wurden bereits die Effekte von LBH589 an Patienten mit akuter myeloischer Leukämie (AML), akuter lymphatischer Leukämie (ALL) und myelodysplastischen Syndrom (MDS) untersucht (Giles et al., 2006).

Auch in Zellen solider Tumore, z. B. beim nicht-kleinzelligen Bronchialkarzinom (NSCLC) und beim (z. T. Cisplatin-resistenten) Ovarialkarzinom, konnte die Kombination von LBH589 mit dem multiplen Rezeptor-Tyrosin-Kinase-Inhibitor AEE788 verstärkt Apoptose auslösen (Yu et al., 2007). LBH589 allein bewirkte eine Sensibilisierung von NSCLC-Zellen für die Strahlentherapie (Geng et al., 2006). LBH589 wurde bereits auch in experimentellen Untersuchungen eingesetzt, um einen Effekt auf Tumorzellkulturen mit Ursprung aus dem Gastrointestinaltrakt zu erforschen. Dabei wurden die Effekte von LBH589 auf Zellen des Pankreaskarzinoms (Haefner et al., 2008) und auf Zellen des biliären Systems mit vielversprechenden Ergebnissen untersucht (Bluethner et al., 2007).

2 Aufgabenstellung und Zielsetzung

Basierend auf den in den letzten Jahren gewonnenen Erkenntnissen zum antineoplastischen Potential von HDAC-Inhibitoren beim kolorektalen Karzinom, war es Ziel dieser Arbeit, die Auswirkungen von LBH589 auf Proliferation und Differenzierung der Zellen aus Zellkulturlinien SW480 (kolorektales Karzinom) und SW620 (Metastase eines kolorektalen Karzinoms) zu untersuchen. Effekte des HDAC-Inhibitors LBH589 auf hämatologische und solide Tumore konnten bereits nachgewiesen werden. Nun galt es festzustellen, ob LBH589 ähnlich wie Butyrat in der Lage ist, einen Anti-Tumor-Effekt auf Zellen des kolorektalen Karzinoms durch die Inhibition von HDACs, in Form einer Abnahme der Zellproliferation bzw. einer Zunahme der Zelldifferenzierung, auszuüben.

3 Material und Methoden

3.1 Material

3.1.1 Zellkulturen, Kulturmedien, Geräte, Software, Chemikalien, Verbrauchsmaterial

Zellkulturen

In den Versuchen wurden die Effekte von LBH589 auf die Zelllinien SW480 und SW620 untersucht. Die im Gastroenterologischen Labor der Universität Würzburg verwendete Zelllinie SW480 stammt aus einem humanen kolorektalen Adenokarzinom eines 50-jährigen Kaukasiers. Die Zelllinie SW620 wurde aus einer Metastase dieses Primärtumors isoliert.

Zellkultur	Hersteller	Herstellungsort
SW480	Deutsche Sammlung von	Braunschweig, Deutsch-
	Mikroorganismen und	land
	Zellkulturen GmbH,	
	(#ACC313)	
SW620	American Type Culture	Rockville, MD, USA
	Collection (ATCC),	
	(#CCL-227)	

 Tabelle 1: Verwendete Zellkulturen

Kulturmedien

Kulturmedium	Bestandteile	Hersteller	Herstellungsort
SW480	RPMI 1640	Life Technologies	Karlsruhe,
	Penicillin-Streptomycin-		Deutschland
	Lösung		
	Foetal Bovine Serum (FBS)		

SW620	DMEM	Life Technologies	Karlsruhe,
	Penicillin-Streptomycin-		Deutschland
	Lösung		
	Foetal Bovine Serum (FBS)		

Tabelle 2: Verwendete Kulturmedien

Geräte

Gerät	Тур	Hersteller	Herstellungsort
Brutschrank	Heraeus-HERA-	Heraeus	Hanau, Deutsch-
	Cell		land
Wasserbad		Köttermann	Hänigsen, Deutsch-
			land
Zentrifuge	Labofuge 400R	Kendro	Hanau, Deutsch-
			land
Ultraschall	Sonoplus GM70	Bandelin	Berlin, Deutschland
Vortex	MS1 Minishaker	IKA	Wilmington, NC,
			USA
Zählkammer	Neubauer Zell-		
	Zählkammer		
Mikroskop	DM IL	Leica	Bensheim,
			Deutschland
Gefrierschrank	-20°C	Liebherr	Ochsenhausen,
			Deutschland
Pipetten	diverse	Eppendorf	Hamburg, Deutsch-
			land
Laminar-Air-Flow	Gelaire BSB 4	Flow Laboratories	Mailand, Italien
Analysegerät AP	COBAS INTEGRA	Roche	Basel, Schweiz
	800		
Zentrifuge	Biofuge fresco	Heraeus	Hanau, Deutsch-
			land

Tabelle 3: Gerätebeschreibungen

Software

Software	Hersteller
Microsoft Office Excel	Microsoft

 Tabelle 4: Benutzte Software

Chemikalien

Chemikalie	Hersteller	Herstellungsort
LBH589	Novartis	Basel, Schweiz
DMSO (Dimethylsulfo-	Sigma-Aldrich	St. Louis, MO, USA
xid)		
PBS (Phosphatgepufferte	Life Technologies	Karlsruhe, Deutschland
Kochsalzlösung)		
Trypsin-EDTA 0,5%	Life Technologies	Karlsruhe, Deutschland
NaCl 0,9%	Merck	Darmstadt, Deutschland
Flüssiger Stickstoff		
Trypanblau Trypan Blue	Life Technologies	Karlsruhe, Deutschland
Stain 0,4%		

Tabelle 5: Chemikalien

Verbrauchsmaterial

Material	Hersteller	Herstellungsort
Pipettenspitzen	Eppendorf	Hamburg, Deutschland
Kulturflaschen T25	Costar	Cambridge, MA, USA
Kulturflaschen T75	Costar	Cambridge, MA, USA
Eppendorf-	Sorenson	West Salt Lake City, UT,
Reaktionsgefäß		USA

 Tabelle 6: Verwendete Verbrauchsmaterialien

3.2 Methoden

3.2.1 Untersuchung der Zellproliferation

Alle Experimente wurden unter sterilen Bedingungen in einem Laminar-Air-Flow durchgeführt und alle Werte wurden durch eine Dreifachbestimmung ermittelt. Zunächst wurden je 1 x 10⁶ Zellen der Zelllinien SW480 und SW620 in 25 cm² Kulturflaschen ausgesät und mit 4 ml des entsprechenden Mediums bei 37 °C und 5 % CO2-Begasung für 72 Stunden inkubiert. Anschließend wurden die Zellen sechs Stunden in serumfreiem Medium kultiviert, um eine Zellwachstumssynchronisation zu erreichen. Nach Zugabe von 10 % FBS-Medium zum serumfreien Medium wurden die Zellen weitere 16 Stunden inkubiert. Als Ausgangswert für die Interpretation des weiteren Versuchs wurden hierbei zunächst die ersten Zellen (zum Zeitpunkt 0 Stunden) geerntet, um den weiteren Verlauf der Zellproliferation vergleichbar einordnen zu können. Die restlichen Zellkulturen wurden dann mit der Testsubstanz LBH589 in verschiedenen Konzentrationen bis zu 72 Stunden kultiviert. Der Effekt von LBH589 auf die Proliferation der Zelllinien SW480 und SW620 wurde in den Konzentrationen 0,1 nM, 1 nM, 10 nM und 100 nM untersucht und nach 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden ermittelt. Als Lösungsmittel in der Stammlösung diente für LBH589 DMSO. Als Kontrollsubstanz wurde daher eine äquimolare DMSO-Lösung verwendet und deren Auswirkung auf die Zellproliferation nach 72 Stunden registriert. Zu den Zeitpunkten 0 Stunden, 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden wurde dann der Medienüberstand jeweils abgesaugt. Anschließend wurden die Zellen mit 3 ml Dulbeccos's PBS abgespült und der Überstand abgesaugt. Nach erneutem Spülen und Absaugen mit 2 ml Trypsin-EDTA wurden noch einmal 1 ml Trypsin-EDTA zugegeben, da durch die Trypsinierung die adhärent wachsenden Zellen vom Kulturflaschenboden abgelöst werden. Nun wurden die Zellkulturen für sieben Minuten bei 37 °C und 5 % CO₂-Begasung inkubiert, danach die Zellkulturflaschen beklopft, um die Zellen vom Flaschenboden abzulösen und die Trypsinierungsreaktion durch die Zugabe von 4 ml des entsprechenden Mediums gestoppt. Der Inhalt der Kulturflaschen wurde jetzt in ein Röhrchen überführt und 0,1 ml der Zellsuspension zusammen mit 0,4 ml Trypanblau in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß gegeben und mit dem Vortex durchmischt. Mit einer Eppendorf-Pipette wurde letztlich

ein Teil der Lösung in eine Neubauer-Zellzählkammer übertragen und unter dem Mikroskop die lebenden und toten Zellen ausgezählt.

Trypanblau ist ein Vitalfarbstoff, der von toten Zellen mit nicht intakter Plasmamembran sofort aufgenommen wird, während er die Zellmembran von lebenden Zellen erst nach ca. 5 - 10 Minuten durchdringt. Dadurch werden lebende von toten Zellen lichtmikroskopisch unterscheidbar. Nach folgender Formel ergab sich die Zellzahl pro Milliliter Zellsuspension:

$$N \ge K \ge V = Zellzahl/ml$$

N = Mittelwert der gezählten vitalen Zellen aus den 4 Großquadranten

 $K = Kammerfaktor 10^4$

V = Verdünnungsfaktor 25 (zusammengesetzt aus Verdünnung 1 : 4 und dem Inhalt einer Kulturflasche von 5 ml, entspricht 5 x 5)

3.2.2 Untersuchung der Zelldifferenzierung

Auch hier wurde ein Großteil der Versuche unter sterilen Bedingungen im Laminar-Air-Flow durchgeführt und alle Werte in einer Dreifachbestimmung ermittelt. Je 2 x 10⁶ Zellen der Zelllinien SW480 und SW620 wurden in 75 cm² Kulturflaschen ausgesät und mit 20 ml entsprechenden Mediums bei 37 °C und 5 % CO₂-Begasung inkubiert. Nach 72 Stunden erfolgte die Bestimmung des 0 Stundenwertes der spezifischen Aktivität der Intestinalen Alkalischen Phosphatase (AP) als Ausgangswert. Die weiteren Zellkulturflaschen wurden mit LBH589 in den Konzentrationen 0,1 nM, 1 nM, 10 nM und 100 nM versetzt und inkubiert, um die Aktivität nach weiteren 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden bestimmen zu können. Analog zum Versuch zur Ermittlung des Einflusses auf die Zellproliferation wurde auch hier zur Kontrolle wieder jeweils eine Kontrolllösung mit äquimolaren Mengen DMSO angefertigt und nach 72 Stunden verarbeitet. Nach 0 Stunden, 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden wurde der Medienüberstand abgesaugt und verworfen und die Zellen mit 3 ml kalter PBS-Lösung gewaschen. Nach erneutem Absaugen wurden die Zellen mit 3 ml NaCl 0,9 % behandelt und mit Hilfe eines Zellschabers vom Flaschenboden gelöst, um die Zellsuspension in eine 15 ml Tube zu überführen. Nachdem die Suspension 10 Minuten lang bei 4 °C und 3500 rpm zentrifugiert wurde, wurde der Überstand abgesaugt und das Pellet mit 1 ml NaCl resuspendiert und in ein Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt. Um die Zellkernmembran zu lysieren, wurde die Zellsuspension in flüssigen Stickstoff schockgefroren und im 37 °C warmen Wasserbad wieder aufgetaut. Dieser Vorgang des Schockgefrierens und Auftauens wurde anschließend noch einmal wiederholt. Dann wurden die Proben auf Eis gelagert und zur Proteinextraktion zweimal 20 Sekunden mit dem Ultraschallgerät (Sonoplus Ultraschall Homogenisator; Sonotrode MS 73; Power Ms 72/D) homogenisiert. Jetzt wurden die Proben 10 Minuten lang bei 4 °C und 5000 rpm zentrifugiert, der Überstand abpipettiert und in ein neues Eppendorf-Reaktionsgefäß überführt, sowie abschließend bis zur späteren Bestimmung der AP- und Proteinkonzentrationen bei -20 °C eingefroren.

Durch Messung der Aktivität des Enzyms der Intestinalen Alkalischen Phosphatase (AP) lässt sich die Zelldifferenzierung von Enterozyten quantifizieren. Nur differenzierte Enterozyten exprimieren die Bürstensaum-Hydrolase AP, während undifferenzierte oder andere Zelltypen diese nicht bilden. Daher ist die AP als Differenzierungsmarker für Enterozyten geeignet und kann u. a. für die Identifizierung von Regulatoren des Zelldifferenzierungsprogramms herangezogen werden (Hinnebusch et al., 2003).

Die Aktivität der AP wurde mit dem Analysegerät COBAS INTEGRA 800 (Fa. Roche) photometrisch nach folgender Reaktion bestimmt:

p-Nitrophenylphosphat + H₂O
$$\xrightarrow{\text{AP}}$$
 p-Nitrophenol + Phosphat

Die Berechnung der spezifischen AP-Aktivität erfolgte mittels Division der AP-Konzentration durch die jeweilige Gesamtproteinkonzentration.

3.2.3 Statistische Auswertung

Die gewonnenen Daten wurden mit dem Programm Microsoft Office Excel 2003 gesammelt und bearbeitet. Sowohl die Aufbereitung der Daten in Diagrammen als auch die statistische Analyse erfolgten mit diesem Programm. Zur Berechnung des Signifikanzniveaus zwischen Mess- und Kontrollwerten bzw. zwischen den einzelnen Messwerten wurde der Student t-Test mit einem Signifikanzniveau von p < 0,05 durchgeführt. Als Grundlage für die statistische Auswertung dienten die Mittelwerte und die Standardabweichung aus drei unabhängigen Experimenten. Die dargestellten Graphen zeigen jeweils den Mittelwert ± Standardabweichung.

4 Ergebnisse

4.1 Einfluss von LBH589 auf die Proliferation

4.1.1 Untersuchungen an der Zelllinie SW480

Nach einer Inkubation mit LBH589 von 72 Stunden konnte eine konzentrationsabhängige Hemmung der Proliferation der Zellen der Zelllinie SW480 gezeigt werden. Allerdings zeigte die Auswertung der Kontrolllösungen mit jeweils äquimolaren Mengen DMSO eine ähnliche oder zum Teil stärkere Hemmung der Zellproliferation.

Nach 72 Stunden ergaben die Werte der Kontrolllösung bei einer Konzentration von LBH589 von 0,1 nM eine leicht niedrigere Zellzahl, wenn auch dieser Unterschied nicht signifikant (p = 0,68) ausfiel (Abbildung 3).



Abbildung 3: Zellproliferation von SW480-Zellen unter 0,1 nM LBH589-Inkubation. Dargestellt ist der Verlauf von adhärent proliferierenden, vitalen (Trypan negativ) Zellen zu den verschiedenen Zeitpunkten. Bei 72 Stunden ist der entsprechende Wert der Kontrolllösung (äquimolare Menge DMSO) vermerkt. Die präsentierten Daten zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei verschiedenen Experimenten.

Auch bei einer Konzentration von LBH589 mit 1 nM erzielte die Kontrolllösung eine nicht signifikant stärkere Proliferationshemmung (p = 0.76) (Abbildung 4).



Abbildung 4: Zellproliferation von SW480-Zellen unter 1 nM LBH589-Inkubation. Dargestellt ist der Verlauf von adhärent proliferierenden, vitalen (Trypan negativ) Zellen zu den verschiedenen Zeitpunkten. Bei 72 Stunden ist der entsprechende Wert der Kontrolllösung (äquimolare Menge DMSO) vermerkt. Die präsentierten Daten zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung aus drei verschiedenen Experimenten.

Bei einer Konzentration von LBH589 von 10 nM wurde keine Kontrolle angefertigt. Doch zeigte sich bei einer LBH589-Konzentration von 100 nM erneut kein signifikanter Unterschied in der Hemmung der Proliferation von Zellen der Zelllinie SW480 gegenüber der Kontrolllösung mit DMSO (p = 0.93) (Abbildung 5).



Abbildung 5: Zellproliferation von SW480-Zellen unter 100 nM LBH589-Inkubation. Dargestellt ist der Verlauf von adhärent proliferierenden, vitalen (Trypan negativ) Zellen zu den verschiedenen Zeitpunkten. Bei 72 Stunden ist der entsprechende Wert der Kontrolllösung (äquimolare Menge DMSO) vermerkt. Die präsentierten Daten zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung aus drei verschiedenen Experimenten. In der Zusammenschau des Verlaufs der Zellzahl der Zelllinie SW480 unter Inkubation mit LBH589 in den Konzentrationen 0,1 nM, 1 nM, 10 nM und 100 nM zeigte sich nach 72 Stunden ein Rückgang der Zellzahl bei allen Konzentrationen mit Ausnahme von LBH589 10 nM. Nach 24 Stunden hemmte LBH589 100 nM die Zellproliferation gegenüber der 10 nM (p = 0,036) und der 0,1 nM (p = 0,009) Testlösung signifikant. Nicht signifikant war dieser Effekt nach 48 Stunden. Nach 72 Stunden inhibierte LBH589 100 nM die Proliferation signifikant stärker als LBH589 0,1 nM (p = 0,013). Nicht signifikant verhielt es sich gegenüber der 10 nM (p = 0,102) und der 1 nM (p = 0,227) Testlösung. Allerdings zeigte die Kontrolllösung mit äquimolaren Mengen DMSO nach 72 Stunden jeweils kein signifikant anderes Ergebnis als die LBH589-Testlösung. In der nachfolgenden Abbildung 6 ist der Effekt von LBH589 in den verschiedenen Konzentrationen auf die Zelllinie SW480 zusammengefasst.



Abbildung 6: Zellproliferation von SW480-Zellen unter LBH589-Inkubation in verschiedenen Konzentrationen. Dargestellt ist der Verlauf von adhärent proliferierenden, vitalen (Trypan negativ) Zellen zu den verschiedenen Zeitpunkten. Die präsentierten Daten zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei verschiedenen Experimenten.

Weder LBH589 noch die Kontrolllösungen mit DMSO übten einen Effekt auf den Anteil toter Zellen (Trypan positiv) im Verlauf der 72 Stunden aus, deren relativer Anteil an der Gesamtzellzahl bei allen Konzentrationen konstant blieb.

4.1.2 Untersuchungen an der Zelllinie SW620

Auch hier konnte nach einer Inkubation von 72 Stunden eine konzentrationsabhängige Hemmung der Proliferation der Zellen der Zelllinie SW620 gezeigt werden. Jedoch wies, nach Auswertung der Lösungen mit jeweils äquimolaren Mengen DMSO, die Kontrolllösung ähnliche Auswirkungen auf. Nach 72 Stunden ergaben die Werte der Kontrolllösung, mit Ausnahme bei LBH589 100 nM, leicht niedrigere Zellzahlen, die aber nicht signifikant ausfielen. Lediglich für LBH589 100 nM konnte eine signifikante Hemmung der Zellproliferation gegenüber der Kontrolllösung gezeigt werden (p = 0,016) (siehe Abbildung 10).

Bei LBH589 0,1 nM zeigte die Kontrolllösung mit DMSO eine nicht signifikant stärkere Proliferationshemmung (p = 0.83) (Abbildung 7).



Abbildung 7: Zellproliferation von SW620-Zellen unter 0,1 nM LBH589-Inkubation. Dargestellt ist der Verlauf von adhärent proliferierenden, vitalen (Trypan negativ) Zellen zu den verschiedenen Zeitpunkten. Bei 72 Stunden ist der entsprechende Wert der Kontrolllösung (äquimolare Menge DMSO) vermerkt. Die präsentierten Daten zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung aus drei verschiedenen Experimenten.

Wenn auch nicht Signifikanz erreichend, wurde die Proliferation durch die DMSO-Kontrolllösung bei einer Konzentration von LBH589 von 1 nM stärker gehemmt (p = 0,32) (Abbildung 8).



Abbildung 8: Zellproliferation von SW620-Zellen unter 1 nM LBH589-Inkubation. Dargestellt ist der Verlauf von adhärent proliferierenden, vitalen (Trypan negativ) Zellen zu den verschiedenen Zeitpunkten. Bei 72 Stunden ist der entsprechende Wert der Kontrolllösung (äquimolare Menge DMSO) vermerkt. Die präsentierten Daten zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung aus drei verschiedenen Experimenten.

Ein ähnliches Ergebnis zeigte sich beim Versuch mit LBH589 10 nM. Auch hier ergab sich eine leicht stärkere Proliferationshemmung durch die Kontrolllösung, die nicht signifikant ausfiel (p = 0,50) (Abbildung 9).



Abbildung 9: Zellproliferation von SW620-Zellen unter 10 nM LBH589-Inkubation. Dargestellt ist der Verlauf von adhärent proliferierenden, vitalen (Trypan negativ) Zellen zu den verschiedenen Zeitpunkten. Bei 72 Stunden ist der entsprechende Wert der Kontrolllösung (äquimolare Menge DMSO) vermerkt. Die präsentierten Daten zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung aus drei verschiedenen Experimenten.

Wie bereits oben erwähnt, konnte lediglich beim Experiment mit LBH589 100 nM eine signifikante Hemmung der Proliferation durch LBH589 gegenüber der Kontrolle gezeigt werden (p = 0.016) (Abbildung 10).



Abbildung 10: Zellproliferation von SW620-Zellen unter 100 nM LBH589-Inkubation. Dargestellt ist der Verlauf von adhärent proliferierenden, vitalen (Trypan negativ) Zellen zu den verschiedenen Zeitpunkten. Bei 72 Stunden ist der entsprechende Wert der Kontrolllösung (äquimolare Menge DMSO) vermerkt. Die präsentierten Daten zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung aus drei verschiedenen Experimenten.

In der Zusammenschau des Verlaufs der Zellzahl der Zelllinie SW620 unter Inkubation mit LBH589 in den Konzentrationen 0,1 nM, 1 nM, 10 nM und 100 nM zeigte sich nach 72 Stunden ein Rückgang der Zellzahl bei allen Konzentrationen mit Ausnahme von LBH589 100 nM. Denn bereits nach 48 Stunden konnte bei LBH589 100 nM ein Rückgang der absoluten Zellzahl beobachtet werden. Dabei hemmte LBH589 100 nM nach 24 Stunden die Zellproliferation gegenüber der 1 nM (p = 0.037) signifikant stärker, wohingegen dieser Effekt gegenüber der 0,1 nM (p = 0,062) und der 10 nM (p = 0,19) Testlösung nicht signifikant ausfiel. Nach 48 Stunden inhibierte LBH589 100 nM nur im Vergleich zu LBH589 10 nM die Proliferation signifikant (p = 0.013). Nach 72 Stunden zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Proliferationshemmung. Ähnliche Absolutwerte der Zellzahl erreichten LBH589 100 nM und LBH589 10 nM (p = 0,32). Währenddessen im Vergleich zwischen LBH589 100 nM bzw. LBH589 10 nM zu LBH589 1 nM (p = 0,096 bzw. p = 0,097) und zu LBH589 0,1 nM (p = 0,097 bzw. p = 0,066) die unterschiedliche Hemmung nicht signifikant ausfiel. In der nachfolgenden Abbildung 11 ist der Effekt von LBH589 in den verschiedenen Konzentrationen auf die Zelllinie SW620 zusammengefasst.



Abbildung 11: Zellproliferation von SW620-Zellen unter LBH589-Inkubation in verschiedenen Konzentrationen. Dargestellt ist der Verlauf von adhärent proliferierenden, vitalen (Trypan negativ) Zellen zu den verschiedenen Zeitpunkten. Die präsentierten Daten zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei verschiedenen Experimenten.

Weder LBH589 noch die Kontrolllösung DMSO übten einen Effekt auf den Anteil toter Zellen (Trypan positiv) im Verlauf der 72 Stunden aus, deren relativer Anteil an der Gesamtzellzahl bei allen Konzentrationen konstant blieb.

4.2 Einfluss von LBH589 auf die Differenzierung

4.2.1 Untersuchungen an der Zelllinie SW480

Im Verlauf des Experiments konnte während den 72 Stunden ein Anstieg der Aktivität des Enzyms Alkalische Phosphatase (AP) nachgewiesen werden. Doch kam es zum stärksten Anstieg der AP bei LBH589 10 nM und nur zu einem geringfügigen Anstieg mit anschließender Stagnation der Expression der AP bei LBH589 100 nM. Andererseits ergaben auch hier die Auswertungen der Kontrolllösung mit äquimolaren Mengen DMSO ähnliche Werte der AP wie bei der entsprechenden LBH589-Lösung bzw. steigerte sich die AP und damit die Differenzierung im Kontrollansatz der Zelllinie SW480 stärker als in den Zellen unter LBH589-Inkubation. Im Verlauf der Inkubation der Zellen mit LBH589 0,1 nM stieg die AP um das 9-fache an, ehe die AP zwischen 48 und 72 Stunden wieder leicht zurückging. Nach 72 Stunden zeigte sich jedoch in der DMSO-Kontrolllösung ein nicht signifikant höherer Wert für die AP und damit der Differenzierung (p = 0,057) (Abbildung 12).



Abbildung 12: Verlauf der AP und damit der Zelldifferenzierung von SW480-Zellen unter 0,1 nM LBH589-Inkubation. Bei 72 Stunden ist der entsprechende Wert der Kontrolllösung (äquimolare Menge DMSO) vermerkt. Die präsentierten Daten zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei verschiedenen Experimenten.

Ein ähnliches Bild ergab sich bei der Untersuchung der Zelllinie SW480 mit LBH589 1 nM. Einer kontinuierlichen Erhöhung der AP um das 8,5-fache des Ausgangswertes über 72 Stunden stand ein nicht signifikant höherer Wert der AP der Zellen unter Einwirkung der Kontrolllösung mit DMSO gegenüber (p = 0,094) (Abbildung 13).



Abbildung 13: Verlauf der AP und damit der Zelldifferenzierung von SW480-Zellen unter 1 nM LBH589-Inkubation. Bei 72 Stunden ist der entsprechende Wert der Kontrolllösung (äqui-

molare Menge DMSO) vermerkt. Die präsentierten Daten zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei verschiedenen Experimenten.

Eine lineare Steigerung der AP bis zum 4,6-fachen des 0-Stundenwertes nach 72 Stunden war bei Inkubation mit LBH589 10 nM zu sehen. Doch erreichte auch hier der Kontrollansatz mit äquimolaren Mengen DMSO einen signifikant höheren Wert nach 72 Stunden (p = 0,038) (Abbildung 14).



Abbildung 14: Verlauf der AP und damit der Zelldifferenzierung von SW480-Zellen unter 10 nM LBH589-Inkubation. Bei 72 Stunden ist der entsprechende Wert der Kontrolllösung (äquimolare Menge DMSO) vermerkt. Die präsentierten Daten zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei verschiedenen Experimenten.

Wenig ausgeprägt erschien der Anstieg der AP (1,8-fach) bei dem Experiment mit LBH589 100 nM. Auch hier war nach 72 Stunden ein signifikant höherer Wert der AP und damit der Differenzierung im Ansatz mit der Kontrolllösung mit DMSO zu ermitteln (p = 0,010) (Abbildung 15).



Abbildung 15: Verlauf der AP und damit der Zelldifferenzierung von SW480-Zellen unter 100 nM LBH589-Inkubation. Bei 72 Stunden ist der entsprechende Wert der Kontrolllösung (äquimolare Menge DMSO) vermerkt. Die präsentierten Daten zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung aus drei verschiedenen Experimenten.

In der Zusammenschau der Untersuchungen an der Zelllinie SW480 zur Differenzierung der Zellen, ausgedrückt durch die Expression der AP, zeigten sich folgende konzentrationsabhängige Effekte des HDAC-Inhibitors LBH589 (Abbildung 16).



Abbildung 16: Verlauf der AP und damit der Zelldifferenzierung von SW480-Zellen unter LBH589-Inkubation in verschiedenen Konzentrationen. Die präsentierten Daten zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei verschiedenen Experimenten.

4.2.2 Untersuchungen an der Zelllinie SW620

Im Verlauf des Experiments konnte während den 72 Stunden ein Anstieg der Aktivität des Enzyms Alkalische Phosphatase (AP) nachgewiesen werden. In den ersten 24 Stunden stieg die AP unter Einwirkung der verschiedenen Konzentrationen von LBH589 stark an. Im weiteren Verlauf veränderte sich die AP nur noch geringfügig, wobei sich die Differenzierung unter LBH589 100 nM, also in der höchsten Konzentration unter den getesteten Konzentrationen, am wenigsten entwickelte. Auch hier ergaben die Auswertungen der Kontrolllösung mit äquimolaren Mengen DMSO höhere Werte der AP als bei der entsprechenden LBH589-Lösung.

Unter Inkubation von Zellen der Linie SW620 mit LBH589 0,1 nM kam es zu einem Anstieg der AP um das 2,7-fache des Ausgangswertes in den ersten 48 Stunden und

einem folgenden Abfall bis zur 72. Stunde. Die AP unter Einfluss der Kontrolllösung mit DMSO lag nach 72 Stunden nicht signifikant höher (p = 0,23) (Abbildung 17).



Abbildung 17: Verlauf der AP und damit der Zelldifferenzierung von SW620-Zellen unter 0,1 nM LBH589-Inkubation. Bei 72 Stunden ist der entsprechende Wert der Kontrolllösung (äquimolare Menge DMSO) vermerkt. Die präsentierten Daten zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei verschiedenen Experimenten.

Beim Experiment mit LBH589 1 nM fand sich nach 24 Stunden ein Anstieg (2,2-fach) der AP und damit der Differenzierung. Doch lag auch hier der AP-Wert nach 72 Stunden im Ansatz der DMSO-Kontrolle nicht signifikant höher (p = 0,17) (Abbildung 18).



Abbildung 18: Verlauf der AP und damit der Zelldifferenzierung von SW620-Zellen unter 1 nM LBH589-Inkubation. Bei 72 Stunden ist der entsprechende Wert der Kontrolllösung (äquimolare Menge DMSO) vermerkt. Die präsentierten Daten zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei verschiedenen Experimenten.

Bei Inkubation mit LBH589 10 nM kam es ebenfalls zum größten Anstieg der Differenzierung innerhalb der ersten 24 Stunden. Nur noch gering stieg der Grad der Differenzierung im weiteren Verlauf auf letztlich das 2,6-fache des 0-Stundenwertes. Nach 72 Stunden liegt der AP-Wert der Kontrolllösung mit DMSO ebenfalls nicht signifikant höher (p = 0,13) (Abbildung 19).



Abbildung 19: Verlauf der AP und damit der Zelldifferenzierung von SW620-Zellen unter 10 nM LBH589-Inkubation. Bei 72 Stunden ist der entsprechende Wert der Kontrolllösung (äquimolare Menge DMSO) vermerkt. Die präsentierten Daten zeigen den Mittelwert ± Standardabweichung aus drei verschiedenen Experimenten.

Der geringste Anstieg der Differenzierung und damit der Zunahme der AP (1,9-fach) zeigte sich beim Versuch mit LBH589 100 nM. Hier lag der Kontrollwert der AP unter Einwirkung von DMSO sogar signifikant höher als unter LBH589 100 nM (p = 0,034) (Abbildung 20).



Abbildung 20: Verlauf der AP und damit der Zelldifferenzierung von SW620-Zellen unter 100 nM LBH589-Inkubation. Bei 72 Stunden ist der entsprechende Wert der Kontrolllösung (äquimolare Menge DMSO) vermerkt. Die präsentierten Daten zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei verschiedenen Experimenten.

In der Zusammenschau der Untersuchungen an der Zelllinie SW620 zur Differenzierung und damit der Expression der AP zeigte sich folgender Effekt des HDAC-Inhibitors LBH589 abhängig von der Konzentration (Abbildung 21).



Abbildung 21: Verlauf der AP und damit der Zelldifferenzierung von SW620-Zellen unter LBH589-Inkubation in verschiedenen Konzentrationen. Die präsentierten Daten zeigen den Mittelwert \pm Standardabweichung aus drei verschiedenen Experimenten.

5 Diskussion

5.1 LBH589 und Zellproliferation

An beiden Zelllinien zeigte sich eine konzentrationsabhängige Hemmung der Proliferation über 72 Stunden, die bei einer Konzentration von LBH589 100 nM sowohl bei der Linie SW480, als auch bei der Linie SW620 am stärksten ausfiel. Es war jedoch nicht möglich diesen Effekt eindeutig auf die Wirkung des HDAC-Inhibitors LBH589 zurückzuführen. Da die Kontrolllösung mit äquimolaren Mengen DMSO nach 72 Stunden meist keinen signifikanten Unterschied zur LBH589-Lösung aufwies, ist es vorstellbar, dass der antiproliferative Effekt allein DMSO vermittelt war. In der vorliegenden Arbeit zeigte sich, dass mit Ausnahme von LBH589 100 nM an der Zelllinie SW620, die DMSO-Kontrolllösung in den weiteren sechs Experimenten ähnliche Zellzahlen wie die entsprechende LBH589-Lösung nach 72 Stunden erzielte. Zum Teil konnte die Kontrolllösung sogar niedrigere Werte der absoluten Zellzahl vorweisen. Daher besteht die Möglichkeit, dass LBH589 selbst keinen Effekt auf Zellen des kolorektalen Karzinoms (SW480) und dessen Metastase (SW620) hat. Dies kann grundsätzlich nicht ausgeschlossen werden, wenngleich auch antiproliferative Wirkungen auf leukämische Zellen, Lymphomzellen und Zellen solider Tumoren beschrieben wurden.

Bereits in weiteren experimentellen Untersuchungen an Tumorzellkulturen mit Ursprung aus anderen Teilen des Gastrointestinaltrakts wurden die Effekte von LBH589 erforscht. Dabei ergaben die Ergebnisse einen Effekt von LBH589 auf Zellen des Pankreaskarzinoms, wobei die Endpunkte der Zellproliferation nach 3 und 6 Tagen bestimmt wurden. Dieser bestand aus einer Wachstumsunterdrückung verschiedener Pankreaskarzinom-Zelllinien, einer erhöhten Apoptoserate, Hyperacetylierung von Histon H4, einer verstärkten Expression von p21^{WAF-1/CIP-1} sowie einem Zyklusarrest am G2/M-Checkpoint. Ein synergetischer Effekt ließ sich zudem für LBH589 und Gemcitabine feststellen (Haefner et al., 2008). Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Bluethner et al. bereits 2007, als sie den Einfluss von LBH589 auf Zelllinien aus Tumoren des biliären Systems untersuchten. Auch hier war eine Wachstumshemmung nach 3 bzw. 6 Tagen, verstärkte Induktion von Apoptose, erhöhte Expression von p21^{WAF-1/CIP-1} und eine Assoziation mit Hyperacetylierung von Histon H4 sowie einem vermehrten Zellzyklusstopp am G2/M-Checkpoint in den Tumorzelllinien nachzuweisen. In vivo vermochte LBH589 nach 28 Tagen die Tumormasse beim Gallengangskarzinom um 66 %, beim Gallenblasenkarzinom sogar um 87 % im Vergleich zum Placebo zu reduzieren. Dabei wurde auch hier der Effekt von Gemcitabine potenziert.

Basierend u. a. auf diesen Ergebnissen galt es den Effekt des HDAC-Inhibitors LBH589 auf Zellen des kolorektalen Karzinoms zu untersuchen. Interessant wäre es, den genauen Verlauf der Zellzahl unter Einwirkung der DMSO-Kontrolllösung bei den oben erwähnten Studien zu kennen. Doch so beschrieben Bluethner et al. bei ihrer Untersuchung zur Wirkung von LBH589 auf Tumorzellen des biliären Traktes lediglich, dass DMSO alleine keinen Einfluss auf das Zellwachstum hatte, ohne jedoch die exakten Daten zu zeigen (Bluethner et al., 2007). Gleiches berichteten auch Haefner et al. bei ihrem Forschungsprojekt. Auch hier ist ihrer Veröffentlichung lediglich zu entnehmen, dass DMSO alleine keinen Einfluss auf das Zellwachstum ausübte, wobei ebenfalls keine genauen Daten genannt werden (Haefner et al., 2008).

Daher ist es schwierig die Ergebnisse der Zellproliferation der vorliegenden Arbeit einzuordnen, da die Hemmung der Zellproliferation nicht eindeutig der Wirkung von LBH589 zugeordnet werden kann. Die Daten zu den DMSO-Kontrolllösungen der oben genannten Studien könnten die Interpretation der Ergebnisse zur Zellproliferation unter LBH589-Einfluss erleichtern. Auch muss beachtet werden, dass die Endpunkte bei Bluethner et al. und Haefner et al. nach 3 bzw. 6 Tagen bestimmt wurden. Im Rahmen der Aufgabenstellung dieser Arbeit wurden die Bestimmungen nach 24 Stunden, 48 Stunden und 72 Stunden durchgeführt.

5.2 LBH589 und Zelldifferenzierung

Bei den Untersuchungen zur Zelldifferenzierung blieb LBH589 ohne konzentrationsabhängigen Einfluss auf Zellen der Linien SW480 und SW620. Nach Auswertung der Kontrolllösung mit jeweils äquimolaren Mengen DMSO schien es sogar so, als ob LBH589 in höheren Konzentrationen im zeitlichen Verlauf einen leicht hemmenden Einfluss auf die Differenzierung der Zellen nahm.

HDAC-Inhibitoren sollen in der Lage sein, Differenzierung in Tumorzellen zu induzieren (Kim et al., 1980; Heerdt et al., 1994). Tumorzellen, die einen differenzierteren Phänotyp exprimieren, verlieren zunehmend ihre Fähigkeit zu proliferieren. Andererseits führen Defekte in den terminalen Differenzierungswegen zu autonomer Proliferation und Inhibition der Apoptose (Schröder et al., 2002). Fortgeschrittene Differenzierung erkennt man morphologisch unter anderem an einer charakteristisch gesteigerten Wasserabsorption (Mariadason et al., 2000) und einer besseren Funktion von Tight Junctions (Mariadason et al., 1997). Biochemisch manifestiert sich eine gesteigerte Differenzierung vor allem in der Expression des Markers Intestinale Alkalische Phosphatase (AP), der eine Rolle bei der Fettaufnahme spielt (Kim et al., 1980; Heerdt et al., 1994).

In dieser Arbeit wurde der Verlauf der AP als Marker für Differenzierung untersucht. Bei der Zelllinie SW480 kam es während der 72 Stunden zu einem Anstieg der AP und somit der Differenzierung, wobei jedoch der Verlauf der einzelnen Konzentrationen und deren Zusammenschau keine eindeutigen Rückschlüsse zuließen. Auch bei der Zelllinie SW620 zeigte sich ein ähnliches Bild. Hier kam es innerhalb der ersten 24 Stunden zum größten Anstieg der AP und nur noch leichten Veränderungen im weiteren Verlauf. Doch auch hier war kein eindeutiger Effekt von LBH589 auf die Konzentration der AP und damit der Zelldifferenzierung abzuleiten. Somit ist festzuhalten, dass der HDAC-Inhibitor LBH589 in den Untersuchungen dieser Arbeit keinen oder sogar in höheren Konzentrationen einen leicht inhibitorischen Einfluss auf die Differenzierung der Zellen der Linien SW480 und SW620 hat.

Daher wäre es sinnvoll in weiteren Arbeiten beispielsweise den genauen Verlauf von anderen, z. B. molekularen Differenzierungsmarkern wie p21^{WAF-1/CIP-1} unter LBH589-Einfluss zu ermitteln. Differenzierung und Zellproliferation sind direkt mit den Cyclinabhängigen Kinasen (CDK) verknüpft, die für den Durchlauf durch die G₁-Phase und den Eintritt in die S-Phase des Zellzyklus notwendig sind. In einer Kolonkrypte nimmt der Gehalt von CDK-2 von der Kryptenbasis zur Spitze hin ab (Chandrasekaran et al., 1996), während der Differenzierungsgrad umgekehrt zunimmt. Der HDAC-Inhibitor Butyrat ist beispielsweise in der Lage, CDK-2 in HT-29-Zellen zu hemmen, in niedrigen Konzentrationen indirekt über Aktivierung von p21^{WAF-1/CIP-1} und Differenzierung (Barnard und Warwick, 1993; Harper et al., 1995), in hohen Konzentrationen auch direkt (Siavoshian et al., 1997).

Neben seiner Funktion in Zellzykluskontrolle und Apoptose hat der CDK-Inhibitor p21^{WAF-1/CIP-1} eine komplexe Rolle in der Zelldifferenzierung (Dotto, 2000). In sich dif-

ferenzierenden Zellen ist der Spiegel von p21^{WAF-1/CIP-1} erhöht (Evers et al., 1996; Gartel et al., 1996). Zellen des kolorektalen Karzinoms weisen hingegen eine verminderte p21^{WAF-1/CIP-1}-Expression auf (Polyak et al., 1996). Dabei korreliert die Suppression von p21^{WAF-1/CIP-1} mit einem niedrigen Zelldifferenzierungsgrad (Doglioni et al., 1996) und mit Mutationen von p53 (Viale et al., 1999). Allerdings lässt sich auch in der späten Differenzierungsphase eine p21^{WAF-1/CIP-1}-Suppression nachweisen (Sherr und Roberts, 1999). Zudem konnte gezeigt werden, dass die p21^{WAF-1/CIP-1}-Expression in kolorektalen Tumoren mit einer verlängerten Überlebenszeit der Patienten einhergeht (Holland et al. 2001). Die Bestimmung von p21^{WAF-1/CIP-1} könnte z. B. dazu beitragen, besser zu verstehen, welche Auswirkungen der HDAC-Inhibitor LBH589 auf die Differenzierung der Zelllinien des kolorektalen Karzinoms besitzt. Dadurch könnte man Einblick erhalten, warum sich keine Steigerung der Differenzierung im Rahmen dieser Arbeit zeigte bzw. ob es sogar Anhaltspunkte dafür gäbe, dass LBH589 hemmend auf die Zelldifferenzierung einwirkt. Eine weitere Aufschlüsselung von molekularen Differenzierungsvorgängen in den Tumorzelllinien unter LBH589-Einwirkung wäre daher nötig, um die Ergebnisse dieser Arbeit bezüglich der Differenzierung weiter zu sichern und besser einordnen zu können.

5.3 HDAC-Inhibitoren und LBH589 in der Anti-Tumortherapie und speziell in der Behandlung des kolorektalen Karzinoms

Histondeacetylasen sind eine der Zielstrukturen gegen die erfolgversprechende Substanzen in der molekularen Tumortherapie entwickelt wurden. Sie spielen eine wichtige Rolle in der Regulation der Gentranskription durch posttranslationale Modifikation von Histonen. Wie sich zunehmend herauskristallisiert, verursacht die Dysregulation von epigenetischen Prozessen eine verminderte transkriptionelle Aktivität von Genen, die mit molekularer Carcinogenese in Zusammenhang stehen (Johnstone und Licht, 2003; Lin et al., 2006). Die Verknüpfung zwischen aberranten epigenetischen Veränderungen und der Entstehung von Tumoren konnte vor allem in den letzten Jahren aufgezeigt werden (Marks et al., 2003; Miller et al., 2003; Marks et al., 2004). Histondeacetylasen (HDACs) und Histonacetyltransferasen (HATs) gehören neben anderen zu den wichtigsten epigenetischen Regulatoren, indem sie den Acetylierungszustand der Histone mit ihrer enzymatischen Aktivität bestimmen (Acharya et al., 2005; Lin et al., 2006). Eine Dysregulation des Zustandes aus Acetylierung und Deacetylierung spielt eine große Rolle für die Entstehung, aber auch für die Suppression von Malignomen.

HDAC-Inhibitoren sind inzwischen ein vielversprechender Ansatz in der Therapie maligner Erkrankungen und zeichnen sich dadurch aus, dass sie in der Lage sind, an HDACs zu binden und sie in ihrer Aktivität der Histondeacetylierung zu hemmen und damit die transkriptionelle Regulation von Genen zu verändern. Dadurch können Differenzierungsmechanismen in Gang gesetzt werden, stetige Zellproliferation inhibiert werden, sowie die Apoptose in maligne transformierten Zellen induziert werden (Marks et al., 2000, Johnstone, 2002; Zhou et al., 2007). Diskutiert werden zudem eine Hemmung der Angiogenese (Kim et al., 2001) und die Aktivierung von Immunantworten (Maeda et al., 2000; Magner et al., 2000; Armeanu et al., 2005).

Eine Proliferationshemmung und Differenzierungsinduktion durch HDAC-Inhibitoren wurde bereits bei verschiedenen Leukämien und soliden Tumoren nachgewiesen (Marks et al., 2000; Weidle und Grossmann, 2000; Krämer et al., 2001; Marks et al., 2001).

Auch bei Kolontumoren zeigte sich eine verstärkte HDAC-Expression, insbesondere eine verstärkte HDAC3-Expression in der Kolonkarzinomzelllinie SW480, die im Rahmen dieser Arbeit verwendet wurde (Spurling et al., 2008). Diese Überexpression führt zu einem Fortschritt des Tumorwachstums durch einerseits epigenetische Repression von Tumorsuppressorgenen und andererseits durch Hypoacetylierung und damit Funktionsmodulierung von Nicht-Histon-Substraten von HDACs. Aus der Umkehr dieser Effekte lässt sich auch der Wirkmechanismus von HDAC-Inhibitoren ableiten. Z. B. kann es durch HDAC-Hemmung zur Hyperacetylierung und damit einer transkriptionellen De-Repression von Tumorsuppressorgenen kommen. Eine durch die Hyperacetylierung ausgelöste Aktivitätsänderung von Transkriptionsfaktoren kann die Genexpression zu Gunsten von Wachstumsstopp und Apoptose beeinflussen. Neben Transkriptionsfaktoren können auch Substrate im Zytoplasma hyperacetyliert werden und damit einen potentiell hemmenden, transkriptionsunabhängigen Einfluss auf den Tumor ausüben (Mariadason, 2008).

Die Veröffentlichungen zum HDAC-Inhibitor Butyrat zeigten eine veränderte Genexpression (Menzel et al., 2002), eine Proliferationshemmung, Stimulierung der Differenzierung sowie Stimulierung der Apoptose durch Erhöhung des pro-apoptotischen Faktors Bak, Erniedrigung des anti-apoptotischen Bcl-X_L und fehlender Aktivierung von NF-κB auf (Lührs et al., 2002). Auch der HDAC-Inhibitor Valproat vermochte Kolonkarzinomzellen im Wachstum zu hemmen und den programmierten Zelltod auszulösen. Beide Effekte korrelierten dabei mit dem Hyperacetylierungsstatus von Histonen. Hinzu kommt, dass Valproat die Expression mehrerer Faktoren der Zellzykluskontrolle, der Apoptose sowie die Caspasenaktivierung modulieren konnte. Zudem kam es zu einer Herunterregulierung von c-Src (einer Tyrosinkinase) durch Valproat und damit einer verstärkten Zytotoxizität des c-Src-Inhibitors Bosutinib als additiven Effekt (Mologni et al., 2009). Die Auswirkungen der HDAC-Inhibitoren Valproat und Butyrat haben gezeigt, welches Potential diese Anti-Tumor-Therapeutika beim kolorektalen Karzinom haben. Ähnliche Effekte auf Wachstumshemmung und Apoptoseinduzierung beim kolorektalen Karzinom konnten für die Hydroxaminsäure Trichostatin A (TSA), Suberoylanilide Hydroxaminsäure (SAHA) (Bordonaro et al., 1999; Mariadason et al., 2000) und das Benzamid MS-275 demonstriert werden (Hu et al., 2003).

Wie bereits erwähnt, ist der HDAC-Inhibitor LBH589, ein Hydroxaminsäurederivat, ein potentieller Inhibitor aller HDAC-Enzyme in Tumoren und hat sein Potenzial in der Anti-Tumor-Therapie bereits in präklinischen Modellen und in vielversprechenden klinischen Studien gezeigt (Atadja P, 2009).

LBH589 wurde bereits in experimentellen Untersuchungen eingesetzt, um einen Effekt auf Tumorzellkulturen mit Ursprung aus dem Gastrointestinaltrakt zu erforschen. Dabei zeigte sich als Effekt von LBH589 auf Zellen des Pankreaskarzinoms (Haefner et al., 2008) und auf Zellen des biliären Systems (Bluethner et al., 2007) eine Wachstumshemmung, eine erhöhte Apoptoserate, eine verstärkte Expression von p21^{WAF-1/CIP-1} sowie ein Zyklusarrest am G2/M-Checkpoint.

5.4 Einordnung der Ergebnisse dieser Arbeit

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass der HDAC-Inhibitor LBH589 in den Untersuchungen im Rahmen dieser Arbeit keinen eindeutig zuordenbaren Einfluss auf die Proliferation bzw. nachweisbaren Einfluss auf die Differenzierung der Zellen der Linien SW480 und SW620 ausüben konnte. Damit konnten bisherige Ergebnisse, die mit LBH589 als auch mit anderen HDAC-Inhibitoren an Zellen des kolorektalen Karzinoms und Zelllinien anderer gastrointestinaler Tumore erzielt wurden, nicht bestätigt oder erweitert werden.

Da es aber bereits vielversprechende Ergebnisse in der Therapie des kolorektalen Karzinoms mit HDAC-Inhibitoren und besonders auch mit dem HDAC-Inhibitor LBH589 bei anderen Tumoren gab, ist es schwierig, dieses Ergebnis einzuordnen. Es besteht die Möglichkeit, dass die Hydroxaminsäure LBH589 lediglich bei diesen beiden Zelllinien keinen eindeutig nachweisbaren Effekt auf Proliferation und Differenzierung zeigte. Deshalb wäre es interessant, Auswirkungen von LBH589 auf andere Zelllinien kolorektaler Tumore zu kennen. Zudem wäre der Verlauf von weiteren molekularen Differenzierungsmarkern wichtig, um weitere Informationen über Differenzierungsvorgänge in diesen beiden Zelllinien unter LBH589-Einfluss zu erhalten. Ein weiterer Ansatz könnte darin bestehen, den Einfluss anderer HDAC-Inhibitoren auf die beiden Zelllinien SW480 und SW620 zu erforschen.

Auch Untersuchungen von LBH589 in Kombination mit etablierten Substanzen in der Behandlung kolorektaler Tumore sind denkbar. Fazzone et al. konnten bereits eine Wirkverstärkung von 5-FU (5-Fluorouracil) durch LBH589 nachweisen. Dies zeigt sich durch vermehrten Zellzyklusarrest und verstärkte Wachstumsinhibition. Eine Überexpression der Thymidylatsynthase (TS) spielt eine Schlüsselrolle in der Resistenzentwicklung kolorektaler Tumore gegenüber der auf 5-FU basierenden Chemotherapie. LBH589 ist in der Lage die Expression der TS signifikant herunter zu regulieren (Fazzone et al., 2009). Ähnlich dem Acetylierungsstatus von Histonen spielt auch deren Methylierungsstatus eine Rolle in der Transkription von Genen. In den letzten Jahren wurden daher auch DNA-Methyltransferase-Inhibitoren (DNMT-Inhibitoren) erforscht. Beispielsweise zeigten HDAC-Inhibitoren gemeinsam mit DNMT-Inhibitoren synergetische Effekte in Untersuchungen an Kolontumoren. Durch diese Kombination kam es zu Zellwachstumshemmung, gesteigerter Differenzierung und verstärkter Apoptoseinduzierung (Zhu und Otterson, 2003).

6 Zusammenfassung

Zahlreiche Studien schreiben Histondeacetylase-Inhibitoren einen Anti-Tumor-Effekt auf verschiedene hämatologische und solide Tumoren durch Apoptoseinduktion, vermehrte Zelldifferenzierung und verminderte Zellproliferation zu. Als Mechanismus wird eine Einflussnahme auf die Genexpression durch Modulation von Histondeacetylasen und deren Auswirkung auf den Acetylierungsstatus von Histonen und Nicht-Histon-Proteinen angenommen. Ziel dieser Arbeit war es, die Auswirkungen des Histondeacetylase-Inhibitors LBH589 auf Proliferation und Differenzierung von Kolonkarzinomzellen und dessen Metastasenzellen in Zellkulturexperimenten zu untersuchen.

Die Untersuchungen wurden an Zellen der Zellkulturlinien SW480 (kolorektales Karzinom) und SW620 (Metastase des kolorektalen Karzinoms) durchgeführt. Für die Zellproliferation wurden die Zellen nach entsprechender Vorbehandlung in einer Neubauer-Zellzählkammer ausgezählt. Zur Feststellung des Verlaufs der Zelldifferenzierung diente die Bestimmung der Intestinalen Alkalischen Phosphatase als Marker. Unter LBH589-Inkubation kam es zu einer Hemmung der Zellproliferation sowohl bei SW480-Zellen als auch bei SW620-Zellen. Allerdings ergab sich kein signifikanter Unterschied bei der Auswertung der Kontrolllösungen mit jeweils äquimolaren Mengen DMSO. Daher konnte dem HDAC-Inhibitor LBH589 im Rahmen dieser Arbeit kein sicherer Effekt auf die Inhibition der Zellproliferation zugeschrieben werden. LBH589 hatte keinen nachweisbaren relevanten Einfluss auf die Differenzierung von Zellen der beiden Zelllinien. Allenfalls konnte ein leicht hemmender Einfluss auf die Zelldifferenzierung gezeigt werden, der jedoch nicht signifikant ausfiel.

Weitere Untersuchungen sind anzustreben, um den Verlauf der Zellproliferation und weiterer Differenzierungsmarker unter dem Einfluss von LBH589 sowie äquimolaren Mengen DMSO detaillierter zu charakterisieren. Zukünftige Arbeiten zu Histondeacetylase-Inhibitoren und deren Effekt auf Zellen des kolorektalen Karzinoms, sowie Histondeacetylase-Inhibitoren in der Kombinationstherapie von kolorektalen Tumoren sind sicher sinnvoll.

7 Literaturverzeichnis

- Acharya MR, Sparreboom A, Venitz J und Figg WD (2005). Rational development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents: a review. Mol Pharmacol 68: 917-932.
- Armeanu S, Pathil A, Venturelli S, Mascagni P, Weiss TS, Göttlicher M, Gregor M, Lauer UM und Bitzer M (2005). Apoptosis on hepatoma cells but not on primary hepatocytes by histone deacetylase inhibitors valproate and ITF2357. J Hepatol 42: 210-217.
- 3. **Atadja** P (2009). Development of the pan-DAC inhibitor panobinostat (LBH589): Successes and challenges. Cancer Lett 2009 [Epub ahead of print].
- 4. **Barnard** JA, **Warwick** G (1993). Butyrate rapidly induces growth inhibition and differentiation in HT-29 cells. Cell Growth Differ 4: 495-501.
- Bluethner T, Niederhagen M, Caca K, Serr F, Witzigmann H, Moebius C, Mossner J, Wiedmann M (2007). Inhibition of histone deacetylase for the treatment of biliary tract cancer: a new effective pharmacological approach. World J Gastroenterol. 13: 4761-4770.
- Bordonaro M, Mariadason JM, Aslam F, Heerdt BG, Augenlicht LH (1999). Butyrate-induced apoptotic cascade in colonic carcinoma cells: modulation of the beta-catenin-Tcf pathway and concordance with effects of sulindac and trichostatin A but not curcumin. Cell Growth Differ 10: 713-720.
- Catley L, Weisberg E, Kiziltepe T, Tai YT, Hideshima T, Neri P, Tassone P, Atadja P, Chauhan D, Munshi NC, Anderson KC (2006). Aggresome induction by proteasome inhibitor bortezomib and alpha-tubulin hyperacetylation by tubulin deacetylase (TDAC) inhibitor LBH589 are synergistic in myeloma cells. Blood 108: 3441-3449.
- Chandrasekaran C, Coopersmith CM, Gordon JI (1996). Use of normal and transgenic mice to examine the relationship between terminal differentiation of intestinal epithelial cells and accumulation of their cell cycle regulators. J Biol Chem 271: 28414-28421.
- 9. Cho KR, Fearon ER (1995). DCC: linking tumor suppressor genes and altered cell surface interactions in cancer. Curr. Opin. Genet. Develop. 5: 72-78.

- Doglioni C, Pelosio P, Laurino L, Macri E, Meggiolaro E, Favretti F, Barbareschi M (1996). p21/WAF1/CIP1 expression in normal mucosa and in adenomas and adenocarcinomas of the colon: its relationship with differentiation. J Pathol 179: 248-253.
- Dotto GP (2000). p21(WAF1/Cip1): more than a break to the cell cycle? Biochim Biophys Acta 1471: M43-56.
- 12. **Esteller** M, **Herman** JG (2002). Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumors. J Pathol 196: 1-7.
- 13. Evers BM, Ko TC, Li J, Thompson EA (1996). Cell cycle protein suppression and p21 induction in differentiating Caco-2 cells. Am J Physiol 271: G722-727.
- 14. Fazzone W, Wilson PM, Labonte MJ, Lenz HJ, Ladner RD (2009). Histone deacetylase inhibitors suppress thymidylate synthase gene expression and synergize with the fluoropyrimidines in colon cancer cells. Int J Cancer 2009 [Epub ahead of print].
- Fearon ER, Vogelstein B (1990). A genetic model for colorectal tumorgenesis. Cell 61: 759-767.
- Ferlay J, Bay F, Pisani P, Parkin DM (2005). GLOBOCAN 2002 Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide IARC CancerBase No. 5, version 2.0 IARCPress, Lyon.
- Gartel AL, Serfas MS, Gartel M, Goufman E, Wu GS, el-Deiry WS, Tyner AL (1996). p21 (WAF1/CIP1) expression is induced in newly nondividing cells in diverse epithelia and during differentiation of the Caco-2 intestinal cell line. Exp Cell Res 227: 171-181.
- Geng L, Cuneo KC, Fu A, Tu T, Atadja PW, Hallahan DE (2006). Histone deacetylase (HDAC) inhibitor LBH589 increases duration of gamma-H2AX foci and confines HDAC4 to the cytoplasm in irradiated non-small cell lung cancer. Cancer Res. 66: 11298-11304.
- 19. Giles F, Fischer T, Cortes J, Garcia-Manero G, Beck J, Ravandi F, Masson E, Rae P, Laird G, Sharma S, Kantarjian H, Dugan M, Albitar M, Bhalla K (2006). A phase I study of intravenous LBH589, a novel cinnamic hydroxamic acid analogue histone deacetylase inhibitor, in patients with refractory hematologic malignancies. Clin Cancer Res. 12: 4628-4635.

- Grignani F, Matteis S, Nervi C, Tomassoni L, Gelmetti V, Cioce M, Fanelli M, Ruthardt M, Ferrara FF, Zamir I, Seiser C, Grignani F, Lazar MA, Minucci S und Pelicci PG (1998). Fusion protein of retinoic acid receptor-alpha recruit histone deacetylases in promyelocytic leukaemia. Nature 391: 815-818.
- 21. **Haefner** M, Bluethner T, Niederhagen M, Moebius C, Wittekind C, Mossner J, Caca K, Wiedmann M (2008). Experimental treatment of pancreatic cancer with two novel histone deacetylase inhibitors. World J Gastroenterol. 14: 3681-3692.
- 22. **Hague** A, Manning AM, Hanlon KA, Huschtscha LI, Hart D, Paraskeva C (1993). Sodium butyrate induces apoptosis in human colonic tumor cell lines in a p53independet pathway: Implications for the possible role of dietary fibre in the prevention of large bowel cancer. Int J Cancer 55: 498-505.
- 23. Harper JW, Elledge SJ, Keyomarsi K, Dynlacht B, Tsai LH, Zhang P, Dobrowolski S, Bai C, Connell-Crowley L, Swindell E, et al. (1995). Inhibition of cyclin-dependent kinases by p21. Mol Biol Cell 6: 387-400.
- 24. **He** LZ, Guidez F, Tribioli C, Peruzzi D, Ruthardt M, Zelent A und Pandolfi PP (1998). Distinct interactions of PML-RARalpha and PLZF-RARalpha with corepressors determine differential responses to RA in APL. Nat Genet 18: 126-
- 25. **Héerdt** BG, Houston MA, Augenlicht LH (1994). Potentiation by specific shortchain fatty acids of differentiation and apoptosis in human colonic carcinoma cell lines. Cancer Res 54: 3288-3293.
- 26. **Hill** LB, O'Connell JB, Ko CY (2006). Colorectal cancer: epidemiology and health services research. Surg Oncol Clin N Am. 15: 21-37.
- 27. **Hinnebusch** BF, Hernderson JW, Siddique A, Malo MS, Zhang W, Abedrapo MA, Hodin RA (2003). Transcriptional activation of the enterocyte differentiation marker intestinal alkaline phosphatase is associated with changes in the acetylation state of histone H3 at a specific site within its promoter region in vitro. J Gastrointest Surg. 7: 237-244.
- Holland TA, Elder J, McCloud JM, Hall C, Deakin M, Fryer AA, Elder JB, Hoban PR (2001). Subcellular localisation of cyclin D1 protein in colorectal tumours is associated with p21(WAF1/CIP1) expression and correlates with patient survival. Int J Cancer 95: 302-306.

- 29. Hu E, Dul E, Sung CM, Chen Z, Kirkpatrick R, Zhang GF, Johanson K, Liu R, Lago A, Hofmann G, Macarron R, de los Frailes M, Perez P, Krawiec J, Winkler J, Jaye M (2003). Identification of novel isoform-selective inhibitors within class I histone deacetylases. J Pharmacol Exp Ther 307: 720-728.
- Huang BH, Laban M, Leung CH, Lee L, Lee CK, Salto-Tellez M, Raju GC, Hooi SC (2005). Inhibition of histone deacetylase 2 increases apoptosis and p21 (Cip1/WAF1) expression, independent of histone deacetylase 1. Cell Death Differ 12: 395-404.
- 31. **Insinga** A, Minucci S und Pelicci PG (2005). Mechanisms of selective anticancer action of histone deacetylase inhibitors. Cell Cycle 4:741-743.
- Ishihama K, Yamakawa M, Semba S, Takeda H, Kawata S, Kimura S, Kimura W (2007). Expression of HDAC1 and CBP/p300 in human colorectal carcinomas. J Clin Pathol 60: 1205-1210.
- Jacobson S, Pillus L (1999). Modifying chromatin and concepts of cancer. Curr Opin Genet Dev 9: 175-184.
- 34. Jenuwein T, Allis CD (2001). Translating the histone code. Science 293:1074-1080.
- 35. **Johnstone** RW (2002). Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. Nat Rev Drug Discov. 1: 287-299.
- 36. **Johnstone** RW, **Licht** JD (2003). Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy: is transcription the primary target? Cancer Cell 4: 13-18.
- 37. Kim YS, Tsao D, Siddiqui B, Whitehead JS, Arntein P, Bennett J, Hicks J (1980). Effects of sodium butyrate and dimethylsulfoxide on biochemical properties of human colon cancer cells. Cancer 45: 1185-1192.
- 38. Kim MS, Kwon HJ, Lee YM, Baek JH, Jang JE, Lee SW, Moon EJ, Kim HS, Lee SK, Chung HY, Kim CW und Kim KW (2001). Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes. Nat Med 7: 437-443.
- 39. **Kinzler** KW, Vogelstein B (1997). Cancer-susceptibility genes. Gatekeepers and caretakers. Nature 386: 761, 763.
- Kouzandes T (1999). Histone acetylases and deacetylases in cell proliferation. Curr Opin Genet Dev 9: 40-48.

- 41. **Krämer** OH, Göttlicher M und Heinzel T (2001). Histone deacetylase as a therapeutic target. Trends Endocrinol Me*tab* 12: 294-300.
- Lin RJ, Nagy L, Inoue S, Shao W, Miller WH Jr. und Evans RM (1998). Role of the histone deacetylase complex in acute promyelocytic leukaemia. Nature 391: 811-814.
- 43. Lin HY, Chen CS, Lin SP, Weng JR, Chen CS (2006). Targeting histone deacetylase in cancer therapy. Med Res Rev 26: 397-413.
- Loss J, Eichhorn C, Nagel E (2006). The effects of promoting colorectal cancer screening on screening utilisation: evaluation of the German Campaign "Aktiv gegen Darmkrebs" (Action against Colorectal Cancer). Z Gastroenterol. 44: 1127-1134.
- 45. Lührs H, Hock R, Schauber J, Weihrauch M, Harrer M, Melcher R, Scheppach W, Bustin M, Menzel T (2002). Modulation of HMG-N2 binding to chromatin by butyrate-induced acetylation in human colon adenocarcinoma cells. Int J Cancer 97: 567-573.
- 46. Lührs H, Kudlich T, Neumann M, Schauber J, Melcher R, Gostner A, Scheppach W, Menzel TP (2002). Butyrate-enhanced TNFalpha-induced apoptosis is associated with inhibition of NF-kappaB. Anticancer Res. 22: 1561-1568.
- Maeda T, Towatari M, Kosugi H und Saito H (2000). Upregulation of costimulatory/adhesion molecules by histone deacetylase inhibitors in acute myeloid leukemia cells. Blood 96: 3847-3856.
- 48. Magner WJ, Kazim AL, Stewart C, Romano MA, Catalano G, Grande C, Kaiser N, Santaniello F und Tomasi TB (2000). Activation of MHC class I, II and CD40 gene expression by histone deacetylase inhibitors. J Immunol 165: 7017-7024.
- Maiso P, Carvajal-Vergara X, Ocio EM, López-Pérez R, Mateo G, Gutiérrez N, Atadja P, Pandiella A, San Miguel JF (2006). The histone deacetylase inhibitor LBH589 is a potent antimyeloma agent that overcomes drug resistance. Cancer Res. 66: 5781-5789.
- 50. **Mariadason** JM (2008). HDACs and HDAC inhibitors in colon cancer. Epigenetics 3: 28-37.

- 51. **Mariadason** JM, Barkla DH, Gibson PR (1997). Effect of short-chain fatty acids on paracellular permeability in Caco-2 intestinal epithelium model. Am J Physiol 272: 705-712.
- 52. **Mariadason** JM, Corner GA, Augenlicht LH (2000). Genetic reprogramming in pathways of colonic cell maturation induced by short chain fatty acids: comparison with trichostatin A, sulindac and curcumin and implications for chemoprevention of colon cancer. Cancer Res 60: 4561-4572.
- Mariadason JM, Rickard KL, Barkla DH, Augenlicht LH, Gibson PR (2000). Divergent phenotypic patterns and commitment to apoptosis of Caco-2 cells during spontaneous and butyrate-induced differentiation. J Cell Physiol 183: 347-354.
- Marks PA, Richon VM und Rifkind RA (2000). Histone deacetylase inhibitors: inducers of differentiation or apoptosis of transformed cells. JNCI Cancer Spectrum 92: 1210-1216.
- Marks P, Rifkind RA, Richon VM, Breslow R, Miller T und Kelly WK (2001). Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. Nat Rev Cancer 1: 194-202.
- 56. **Marks** PA, Miller T, Richon VM (2003). Histone deacetylases. Curr Opin Pharmacol 3: 344-351.
- 57. **Marks** PA, Richon VM, Miller T, Kelly WK (2004). Histone deacetylase inhibitors. Adv Cancer Res 91: 137-168.
- 58. **Menzel** T, Schauber J, Kreth F, Kudlich T, Melcher R, Gostner A, Scheppach W, Lührs H (2002). Butyrate and aspirin in combination have an enhanced effect on apoptosis in human colorectal cancer cells. Eur J Cancer Prev. 11: 271-281.
- 59. **Miller** TA, Witter DJ, Belvedere S (2003). Histone deacetylase inhibitors. J Med Chem 46: 5097-5116.
- 60. **Minucci S, Pelicci** PG (2006). Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. Nat Rev Cancer 6: 38-51.
- Mologni L, Cleris L, Magistroni V, Piazza R, Boschelli F, Formelli F, Gambacorti-Passerini C (2009). Valproic acid enhances bosutinib cytotoxicity in colon cancer cells. Int J Cancer 124: 1990-1996.

- Nakagawa M, Oda Y, Eguchi T, Aishima S, Yao T, Hosoi F, Basaki Y, Ono M, Kuwano M, Tanaka M, Tsuneyoshi M (2007). Expression profile of class I histone deacetylases in human cancer tissues. Oncol Rep 18:769-774.
- Polyak K, Hamilton SR, Vogelstein B, Kinzler KW (1996). Early alteration of cell-cycle-regulated gene expression in colorectal neoplasia. Am J Pathol 149: 381-387.
- 64. **Qian** DZ, Kato Y, Shabbeer S, Wei Y, Verheul HM, Salumbides B, Sanni T, Atadja P, Pili R (2006). Targeting tumor angiogenesis with histone deacetylase inhibitors: the hydroxamic acid derivative LBH589. Clin Cancer Res. 12: 634-642.
- 65. **Rasheed** WK, Johnstone RW und Prince HM (2007). Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. Expert Opin Investig Drugs 16:659-678.
- Riggs MG, Whittaker RG, Neumann JR, Ingram VM (1977). n-Butyrate causes histone modification in HeLa and Friend erythroleukaemia cells. Nature 268: 462-465.
- 67. **Rosato** RR, **Grant** S (2003). Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. Cancer Biol Ther 2: 30-37.
- 68. **Scheppach** W (1991). Bedeutung von Ballaststoffen für die Entstehung und Therapie gastroenterologischer Erkrankungen. Akt Ernähr 16: 143-145.
- Schroeder K, Koschmieder S, Ottmann OG, Hoelzer D, Hauser H, Mueller PP (2002). Coordination of cell growth in cocultures by a genetic proliferation control system. Biotechnol Bioeng 78: 346-352.
- 70. **Sherr** CJ, **Roberts** JM (1999). CDK inhibitors: positive and negative regulators of G1-phase progression. Gene Dev 13: 1501-1512.
- 71. Siavoshian S, Blottiere HM, Cherbut C, Galmiche JP (1997). Butyrate stimulates cyclin D and p21 and inhibits cyclin-dependent kinase 2 expression in HT-29 colonic epithelial cells. Biochem Biophys Res Commun 232: 169-172.
- 72. **Somasundaram** K (2000). Tumor suppressor p53: regulation and function. Front Biosci 5: 424-437.
- Spurling CC, Godman CA, Noonan EJ, Rasmussen TP, Rosenberg DW, Giardina C (2008). HDAC3 overexpression and colon cancer cell proliferation and differentiation. Mol Carcinog 47: 137-147.

- 74. **Su** LK, Vogesltein B, Kinzler KW (1993). Association of the APC tumor suppressor proteins with catenins. Science 262: 1734-1737.
- 75. **Viale** G, Pellegrini C, Mazzarol G, Maisonneuve P, Silverman ML, Bosari S (1999). p21WAF1/CIP1 expression in colorectal carcinoma correlates with advanced disease stage and p53 mutations. J Pathol 187: 302-307.
- Vogelstein B, Fearon ER, Hamilton SR, Kern SE, Preisinger AC, Leppert M, Nakamura Y, White R, Smits AMM, Bos JL (1988). Genetic alterations during colorectal-tumor development. N Engl J Med 319: 525-532.
- 77. Vousden KH (2000). p53: death star. Cell 103: 691-694.
- Weidle UH, Grossmann A (2000). Inhibition of histone deacetylases: a new strategy to target epigenetic modifications for anticancer treatment. Anticancer Res 20: 1471-1485.
- 79. Wilson AJ, Byun DS, Popova N, Murray LB, L'Italien K, Sowa Y, Arango D, Velcich A, Augenlicht LH, Mariadason JM (2006). Histone deacetylase 3 (HDAC3) and other class I HDACs regulate colon cell maturation and p21 expression and are deregulated in human colon cancer. J Bio Chem 281: 13548-13558.
- Wu J, Grunstein M (2000). 25 years after the chromosome model: chromatin modifications. Trends Biochem Sci 25: 619-623.
- 81. Yu C, Friday BB, Lai JP, McCollum A, Atadja P, Roberts LR, Adjei AA (2007). Abrogation of MAPK and Akt signaling by AEE788 synergistically potentiates histone deacetylase inhibitor-induced apoptosis through reactive oxygen species generation. Clin Cancer Res. 13: 1140-1148.
- 82. **Zhou** Q, Atadja P, Davidson NE (2007). Histone deacetylase inhibitor LBH589 reactivates silenced estrogen receptor alpha (ER) gene expression without loss of DNA hypermethylation. Cancer Biol Ther. 6: 64-69.
- Zhu P, Martin E, Mengwasser J, Schlag P, Janssen KP, Gottlicher M (2004). Induction of HDAC2 expression upon loss of APC in colorectal tumorigenesis. Cancer Cell 5: 455-463.
- 84. Zhu WG, Otterson GA (2003). The interaction of histone deacetylase inhibitors and DNA methyltransferase inhibitors in the treatment of human cancer cells. Curr Med Chem Anticancer Agents 3: 187-199.

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich Herrn Professor Dr. med. M. Scheurlen sowie meinem Betreuer und Leiter des gastroenterologischen Labors, Herrn Priv.-Doz. Dr. med. R. Melcher, für die Möglichkeit danken, unter ihrer Leitung dieses Thema bearbeiten und in ihrem Labor die dafür notwendigen Untersuchungen durchführen zu können.

Herrn Professor Dr. med. C.-T. Germer danke ich für die Übernahme des Koreferates und des zweiten Prüfungsfaches in der mündlichen Prüfung.

Herrn Dr. med. T. Kudlich möchte ich sehr für die Unterstützung und Anregungen im schriftlichen Teil dieser Arbeit und Frau Elisabeth Kelber für die Unterstützung und Anregungen bei der Durchführung des praktischen Teils dieser Arbeit danken.

Für die geduldige Betreuung und Anregung im praktischen und schriftlichen Teil dieser Arbeit gilt besonderer Dank meinem Betreuer und Doktorvater Herrn Priv.-Doz. Dr. med. R. Melcher.

Dem ganzen Team des Gastro-Labors, vor allem Frau Elisabeth Kelber und Frau Donata Kuhn, gilt mein aufrichtiger Dank für die technische und moralische Unterstützung im Verlauf dieser Arbeit.