

Präklinische Studien zur Behandlung des Nierenzellkarzinoms durch den Histondeacetylase-Inhibitor Valproat und Interferon-alpha



Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Naturwissenschaften

vorgelegt beim Fachbereich Biowissenschaften
der Johann Wolfgang Goethe-Universität
in Frankfurt am Main

von
Eva Jünger
aus Frankfurt am Main

Frankfurt 2009
D30

vom Fachbereich Biowissenschaften der Johann Wolfgang Goethe-Universität als
Dissertation angenommen.

Dekan:

Gutachter: Herr Prof. Dr. phil. nat. R. Blaheta

Herr Prof. Dr. phil. nat. J. Bereiter-Hahn

Datum der Disputation:

Die Durchführung des praktischen Teils der vorliegenden Dissertation wurde im Januar 2006 im Zentrum der Chirurgie, Klinik für Urologie und Kinderurologie begonnen. Betreuende Doktorväter waren Herr Prof. Dr. phil. nat. R. Blaheta und Herr Prof. Dr. phil. nat. J. Bereiter-Hahn.

I Inhaltsverzeichnis

I	INHALTSVERZEICHNIS.....	I
II	ABBILDUNGSVERZEICHNIS	V
III	TABELLENVERZEICHNIS	VI
IV	ABKÜRZUNGSVERZEICHNIS	VII
1	EINLEITUNG.....	1
1.1	Das Nierenzellkarzinom	1
1.2	Molekulare Grundlagen des Nierenzellkarzinoms	2
1.3	Derzeitige Therapien	3
1.4	Molekulare Therapieansätze beim NZK	4
1.4.1	Tyrosinkinase-Inhibitoren.....	4
1.4.1.1	Sorafenib (Nexavar®)	4
1.4.1.2	Sunitinib (Sutent®).....	5
1.4.2	mTOR-Inhibitoren	5
1.4.2.1	Temsirolimus (Torisel®)	5
1.4.2.2	RAD001 (Everolimus, Afinitor®).....	6
1.4.3	Antikörpertherapie	6
1.4.3.1	Bevacizumab (Avastin™)	6
1.4.4	Histondeacetylase-Inhibitoren.....	6
1.4.4.1	Funktion der Histonacetyltransferasen und Histondeacetylasen.....	7
1.4.4.2	HDAC-Aktivität in malignen Tumorentitäten	8
1.4.4.3	HDAC-Klassen	9
1.4.4.4	HDAC-Inhibitoren	9
1.4.4.5	Valproat.....	10
1.4.5	Kombinationstherapie: VPA + Interferon-alpha	12
1.5	Aufgabenstellung	14
2	MATERIAL.....	15
2.1	Apparaturen	15
2.2	Verbrauchsmaterial	16
2.3	Chemikalien und Agenzien	17
2.4	Nährmedien.....	19
2.4.1	Nährlösungen und Zusätze	19
2.4.2	Zusammensetzung	20
2.4.2.1	M199.....	20
2.4.2.2	RPMI 1640	20

2.5	Zellkulturen	21
2.5.1	HUVEC = <i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i>	21
2.5.2	PTC = proximale Tubulusepithelzellen	21
2.5.3	Caki-1	21
2.5.4	Caki-2	21
2.5.5	A498	21
2.5.6	KTCTL-26	21
2.6	Tiermodell.....	22
3	METHODEN.....	23
3.1	Zellkulturarbeiten.....	23
3.1.1	Umsetzen (= <i>Splitten</i>) konfluenter Zellen	23
3.1.2	Einfrieren von Zellen	23
3.1.3	Auftauen von Zellen	23
3.1.4	Behandlung mit VPA und IFN-alpha	24
3.2	Analyse des Tumorwachstums in vitro	24
3.2.1	Proliferation der NZK-Zellen - MTT-Test	24
3.2.2	Analyse des Zellzyklus.....	26
3.2.3	Intrazelluläre Expression von Zellzyklusproteinen – Western Blot Analyse	26
3.2.3.1	Proteinextraktion aus NZK-Zellen.....	26
3.2.3.2	Proteinbestimmung	27
3.2.3.3	Proteinauftrennung.....	28
3.2.3.4	Western-Hybridisierung.....	29
3.2.3.5	Immunfärbung und Chemolumineszenz	29
3.2.3.6	<i>Stripping</i>	31
3.2.4	Apoptose	32
3.2.4.1	Annexin V-FITC <i>Apoptosis Detection Kit I</i>	32
3.2.4.2	Quantikine <i>Human active Caspase-3 Immunoassay</i>	33
3.3	Untersuchung von Adhäsions- und Migrationsphänomenen... 33	
3.3.1	Adhäsion an Endothelzellen (HUVEC)	34
3.3.2	Adhäsion an immobilisierte extrazelluläre Matrixproteine (EZM-Proteine) 35	
3.3.3	Intrazelluläre Expression relevanter Adhäsionsproteine - Western Blot Analyse.....	35
3.3.4	Oberflächenexpression der Integrinsubtypen und CD44- <i>Splicevarianten</i> - Durchflusszytometrie/FACScan-Analyse.....	36
3.3.5	Analyse des intrazellulären F-Aktin-Gehalts.....	39
3.4	Evaluierung der HDAC-Aktivität	39
3.4.1	HDAC <i>Colorimetric Assay</i>	40
3.4.1.1	Gewinnung des Kernextrakts	40
3.4.1.2	Proteinbestimmung	41
3.4.1.3	HDAC <i>Colorimetric Assay</i>	41
3.4.2	Intrazelluläre Expression der HDACs und Histone – Western Blot Analyse	41
3.5	Analyse relevanter Onkoproteine und Tumorsuppressoren 43	
3.5.1	Intrazelluläre Expression von Onkoproteinen und Tumorsuppressoren – Western Blot Analyse.....	43
3.5.2	Expression von Onkoproteinen und Tumorsuppressoren nach EGF-Stimulation.....	44

3.5.2.1	Intrazelluläre Expression nach EGF-Stimulation.....	44
3.5.2.2	Oberflächenexpression des EGF-Rezeptors nach EGF-Stimulation	44
3.6	Evaluierung der Genaktivität	45
3.6.1	RNA-Extraktion	45
3.6.2	Quantitative Bestimmung des RNA-Gehalts	46
3.6.3	Qualitätskontrolle der RNA.....	46
3.6.4	<i>Microarray</i> -Analyse	47
3.6.4.1	<i>Target Preparation</i>	47
3.6.4.2	<i>Hybridisierung</i>	48
3.6.4.3	Färbung.....	48
3.6.4.4	<i>Scan</i> und Qualitätskontrolle der <i>Chips</i>	48
3.6.4.5	Normalisierung der Daten	48
3.6.4.6	<i>Unsupervised</i> Analyse.....	48
3.6.4.7	<i>Supervised</i> Analyse	49
3.6.5	Quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion = <i>Real Time quantitative Polymerase Chain Reaktion (RT qPCR)</i>	49
3.6.5.1	cDNA-Synthese.....	49
3.6.5.2	quantitative Genexpressionsanalyse	49
3.7	Tierexperimentelle Studien	51
3.7.1	Analyse des Tumorwachstums in vivo	51
3.7.2	Intrazelluläre Proteinexpression in vivo	51
3.8	Statistik.....	53
4	ERGEBNISSE	54
4.1	Vorstudien – Dosisfindung	54
4.1.1	VPA: Dosis-Wirkungs-Analyse	54
4.1.2	IFN-alpha: Dosis-Wirkungs-Analyse	57
4.2	Anti-proliferative Wirkung von VPA und IFN-alpha	57
4.3	Apoptoseinduktion durch VPA und IFN-alpha im Nierenzellkarzinom.....	58
4.4	Inhibition der Adhäsion - biologische Analysen.....	59
4.4.1	Adhäsion an Endothelzellen (HUVEC)	59
4.4.2	Adhäsion an extrazelluläre Matrixproteine (EZM).....	61
4.5	Modulation des intrazellulären F-Aktin-Gehalts.....	63
4.6	Regulation des Zellzyklus mittels VPA und IFN-alpha	63
4.6.1	Einfluss von VPA und IFN-alpha auf die Zellzyklusphasen	63
4.6.2	Einfluss von VPA und IFN-alpha auf die Expression von Zellzyklusproteinen	65
4.7	Modulation der Expression Adhäsions-regulierender Proteine	67
4.7.1	Integrin-Oberflächenexpression	67
4.7.2	Intrazelluläre Integrinexpression	69
4.7.3	Expression relevanter Signalproteine.....	70
4.7.4	CD44-Oberflächenexpression	71
4.8	Modulation intrazellulärer Signalwege	73

4.9	Inhibition der HDAC-Aktivität - Histonhyperacetylierung	75
4.10	Modulation der Genexpression durch VPA und IFN-alpha	77
4.10.1	<i>Microarray</i> -Analysen	77
4.10.1.1	<i>unsupervised</i> Analyse	77
4.10.1.2	<i>supervised</i> Analyse	77
4.10.2	Verifizierung der <i>Microarray</i> -Daten mittels <i>Real Time qPCR</i>	85
4.11	In vivo Studien am xenogenen Mausmodell.....	90
5	DISKUSSION	92
5.1	Proliferations-Inhibition nach VPA-Behandlung - Synergie durch Kombination mit IFN-alpha	93
5.2	Adhäsion und Invasion nach VPA- und IFN-alpha-Gabe, Modulation der korrespondierenden Signaltransduktion	97
5.3	HDAC-Inhibition mittels VPA - Wirkungsverstärkung durch IFN- alpha	101
5.4	Veränderung der Expression weiterer Onkoproteine durch VPA und IFN-alpha.....	102
5.5	Durch VPA und IFN-alpha alterierte Genexpressionsprofile ..	105
5.6	VPA vermindert das Tumolvolumen und verändert die Proteinexpression in vivo	111
5.7	Schlussfolgerung und Ausblick	113
6	ZUSAMMENFASSUNG	115
7	LITERATURVERZEICHNIS.....	117
8	ANHANG.....	141
8.1	Microarray - unsupervised Analyse	141
8.2	Microarray - Datentabellen.....	143
9	DANKSAGUNG	165
10	LEBENS LAUF	167
11	PUBLIKATIONS LISTE	170

II Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Konformationen des Chromatins in Abhängigkeit der Histonmodifikationen.....	8
Abbildung 2: Strukturformel von Valproat.....	11
Abbildung 3: Aminosäuresequenz des IFN-alpha-2a.....	13
Abbildung 4: VPA-Dosisfindung: Proliferation mittels MTT-Assay.....	55
Abbildung 5: VPA-Dosisfindung: Adhäsion an Endothel.....	56
Abbildung 6: Proliferation ermittelt durch MTT-Assay.....	58
Abbildung 7: Apoptose: Annexin V-FITC- und Propidiumiodid-Färbung.....	59
Abbildung 8: Adhäsion an Endothel.....	60
Abbildung 9: Adhäsion an Endothel: Fotografien der Assays.....	60
Abbildung 10: Adhäsion an EZM.....	62
Abbildung 11: Intrazellulärer F-Aktin-Gehalt: Durchflusszytometrie.....	63
Abbildung 12: Zellzyklusphasen: Durchflusszytometrie. Prozentualer Anteil der synchronisierten Caki-1 an der G0/G1-, S- und G2/M-Phase.....	64
Abbildung 13: Zellzyklusproteine: Western Blot Analyse.....	66
Abbildung 14: Oberflächenexpression der alpha-Integrine: Durchflusszytometrie.....	67
Abbildung 15: Oberflächenexpression der beta-Integrine: Durchflusszytometrie.....	68
Abbildung 16: Proteinexpression der alpha- und beta-Integrine: Western Blot Analyse.....	70
Abbildung 17: Integrinaktivität: Western Blot Analyse. ILK = Integrin-linked Kinase, FAK = <i>Focal Adhesion</i> Kinase, pFAK = phosphoryliertes FAK.....	71
Abbildung 18: Oberflächenexpression der CD44-Rezeptoren: Durchflusszytometrie.....	73
Abbildung 19: Tumorsuppressoren und Protoonkogene: Western Blot Analyse.....	74
Abbildung 20: HDAC-Aktivität: Durchflusszytometrie.....	75
Abbildung 21: Proteinexpression der HDACs und Histone (quantitativ und acetyliert). Western Blot Analyse.....	76
Abbildung 22: Zeit-abhängige Veränderungen des Genprofils: <i>Microarray</i> -Analyse.....	78
Abbildung 23: Therapie-abhängige Modulationen des Genprofils: <i>Microarray</i> -Analyse.....	79
Abbildung 24: Genexpression unbehandelter versus behandelter Caki-1 Zellen: <i>Microarray</i> -Analyse. Farbdigramm (= Heatmap)	80
Abbildung 25: Tumorstadium xenogen transplantierte Caki-1 Zellen in Nacktmäusen.....	90
Abbildung 26: Expression regulatorischer Proteine aus Tumoren xenogen mit Caki-1 Zellen transplantierte Nacktmäuse. Western Blot Analyse.....	91
Abbildung 27: Skizzierte Übersicht der Wirkmechanismen einer VPA- und VPA/IFN-alpha-Behandlung.....	113
Abbildung 28: Korrelation zwischen den Genprofilen behandelter Caki-1 aus den 3 Sets (A, B, C): Dargestellt in Form <i>unsupervised Cluster</i> im Dendrogramm.....	141

III Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Klassen der HDAC-Inhibitoren	10
Tabelle 2: Western Blot: Zusammensetzung der Trenngele.	28
Tabelle 3: Western Blot: Zusammensetzung des 4 %igen Sammelgels.	28
Tabelle 4: Western Blot: Pufferlösungen	30
Tabelle 5: Western Blot: Zellzyklusproteine. Antikörper	31
Tabelle 6: Annexin V-FITC Apoptose Detektions Kit I.....	33
Tabelle 7: Western Blot: Integrinsubtypen und Proteine des Integrin-Signalwegs. Antikörper.....	36
Tabelle 8: Durchflusszytometrie: Integrinsubtypen und CD44- <i>Splicevarianten</i> . Antikörper	38
Tabelle 9: Durchflusszytometrie: F-Aktin-Nachweis. Antikörper.....	39
Tabelle 10: Kernextraktion: Zusammensetzung des hypotonischen und Extraktionspuffers.....	40
Tabelle 11: Western Blot: HDACs, Histone und acetylierte Histone. Antikörper	42
Tabelle 12: Western Blot: Onkoproteine und Tumorsuppressoren. Antikörper	43
Tabelle 13: Western Blot: Proteine der EGF- und VEGF-Signalkaskaden. Antikörper.	44
Tabelle 14: Durchflusszytometrie: Oberflächenexpression des EGF-Rezeptors. Antikörper.....	45
Tabelle 15: RT qPCR: Primer.....	50
Tabelle 16: Western Blot: Tierexperimentelle Studien. HDACs, Histone und acetylierte Histone sowie Zellzyklus- und Apoptoseproteine. Antikörper	53
Tabelle 17: Durchflusszytometrie: Datentabelle der Oberflächenexpression der alpha- und beta-Integrine von Caki-1 Zellen	69
Tabelle 18: Durchflusszytometrie: Datentabellen der Oberflächenexpression der CD44-Rezeptoren von Caki-1 Zellen.....	72
Tabelle 19: <i>Microarray</i> -Daten: Veränderte Gentranskripte nach 12-stündiger Applikation. <i>Fold change</i> > 1,5	84
Tabelle 20: <i>Microarray</i> -Daten: Veränderte Gentranskripte nach 3-tägiger Applikation. <i>Fold change</i> > 1,5.	84
Tabelle 21: <i>Microarray</i> -Daten: Veränderte Gentranskripte nach 5-tägiger Applikation. <i>Fold change</i> > 1,5	85
Tabelle 22: <i>RT qPCR</i> : nach 12-stündiger Applikation	87
Tabelle 23: <i>Microarray</i> -Daten – Verifizierung durch <i>RT qPCR</i> : nach 12-stündiger Applikation	87
Tabelle 24: <i>RT qPCR</i> : nach 3-tägiger Applikation.....	88
Tabelle 25: <i>Microarray</i> -Daten – Verifizierung durch <i>RT qPCR</i> : nach 3-tägiger Applikation.....	88
Tabelle 26: <i>RT qPCR</i> : nach 5-tägiger Applikation.....	89
Tabelle 27: <i>Microarray</i> -Daten – Verifizierung durch <i>RT qPCR</i> : nach 5-tägiger Applikation.....	89
Tabelle 28: <i>Microarray</i> -Daten: Alphabetisch sortiert. 12-stündige Behandlung	149
Tabelle 29: <i>Microarray</i> -Daten: Alphabetisch sortiert. 3-tägige Behandlung	155
Tabelle 30: <i>Microarray</i> -Daten: Alphabetisch sortiert. 5-tägige Behandlung	164

IV Abkürzungsverzeichnis

Abb.	Abbildung
Ac	Acetyl
AMBP	Alpha-1-Mikroglobulin/Bikunin Vorläufer
ANGPTL	Angiopoetin- <i>like</i>
APDS	Ammoniumperoxodisulfat
Akt	Serin/Threonin Kinase, auch Proteinkinase B
BIC	Bikarbonat
BIRC5	Survivin
bp	Basenpaare
BD	Becton Dickinson
BSA	<i>Bovine Serum Albumin</i> = Albumin aus Rinderserum
CAM	<i>Cell Adhesion Molecule</i> = Zelladhäsionsmolekül
CAMK2N2	Kalzium/Kalmodulin-abhängige Proteinkinase II Inhibitor
Cdk	<i>Cyclin-dependent Kinase</i> = Zyklin-abhängige Kinase
cDNA	<i>complementary DNA</i> = komplementäre DNA
cRNA	aus cDNA gewonnene RNA
CLDN	Claudin
CM-Dil	Chlormethylbenzamid
CNTN	Kontaktin
COL	Kollagen
CORO2A	Koronin-2A
CP	Ceruloplasmin, Ferroxidase
CT	Computertomographie
CXCR4	α -Chemokin Rezeptor 4
DACT3	Dapper, Wnt-Signalweg-Inhibitor
DAVID	<i>database for annotation, visualisation and integrated discovery</i> , Programm zur funktionellen Analyse von <i>Microarray</i> -Daten
DDR	Discoidin-Domäne Rezeptorfamilie
DDX	<i>Dead Box</i> Polypeptid
dest.	destilliert
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure (bzw. - <i>acid</i>)
DTT	Dithiothreitol, auch Clelands Reagenz genannt
DKFZ	Deutsche Krebsforschungszentrum

DKK	Dickkopf
DRD1IP	Dopaminrezeptor D1-interagierendes Protein
DSMZ	Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
ECGF	<i>Endothelial Cell Growth Factor</i> = endothelialer Zellwachstumsfaktor
ECL	<i>Enhanced Chemiluminescence</i> = verstärkte Chemolumineszenzlösung
EGF	<i>Epidermal Growth Factor</i> = epidermaler Wachstumsfaktor
EGFR	<i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> = epidermaler Wachstumsfaktor Rezeptor
EDTA	Ethylendiamintetraacetat
ELISA	<i>Enzyme-linked Immunosorbent Assay</i> = Enzym-gekoppelter Immunadsorptionstest
EPO	<i>Experimental Pharmacology & Oncology</i> GmbH
ERK	<i>Extracellular Signal/Ligand-Regulated Kinase</i> = extrazelluläre Signal-regulierte Kinase
EZM	extrazelluläre Matrix
FACS	<i>Fluorescence Activated Cell Sorting</i> = Durchflusszytometrie
FAK	<i>Focal Adhesion Kinase</i> = Fokale Adhäsions-Kinase
F-Aktin	Filamentöses Aktin
FBS	<i>Foetal Bovine Serum</i> = fötales Rinderserum
FGF	<i>Fibroblast Growth Factor</i> = Fibroblasten Wachstumsfaktor
FGFBP	FGF Bindeprotein
FITC	Fluoreszein Isothiozyanat
Fmk	Fluoromethylketon
G0/1- & G2-Phase	Gap-Phasen, wichtige Kontrollpunkte des Zellzyklus
GAP	<i>Growth-associated Protein</i> = Wachstum-assoziiertes Protein
GAPDH	Glyceraldehyd-3-Phosphat Dehydrogenase
GBP1	Guanylat Bindeprotein-1
GCOS	<i>GeneChip Operating Software</i>
GCV	Ganciclovir
HAT	Histonacetyltransferase
HBSS	<i>Hanks Balanced Salt W/O Phenol Rad</i>
HDAC	Histondeacetylase
HEPES	2-(4-(2-Hydroxyethyl)-1-Piperazin)-Ethansulfonsäure
HIF-1 α	Hypoxie-induzierter Faktor-1 α

HLA	siehe MHC
HRP	<i>Horseradish peroxidase</i> = Meerrettichperoxidase
HT	<i>Human Transcript</i>
HUVEC	<i>Human Umbilical Vein Endothelial Cells</i> = humane Endothelzellen aus einer Umbilikalvene
ICAM	<i>Intercellular Cell Adhesion Molecule</i> = interzelluläres Zelladhäsionsmolekül
IFI	Interferon-induziertes Protein
IFN	Interferon
Ig	Immunglobulin
IL	Interleukin
ILK	<i>Integrin-linked Kinase</i> = Integrin-gekoppelte Kinase
IPA	<i>Ingenuity Pathway Analysis Upgrade Advisor</i> , Program zur Signalweganalyse von <i>Microarray</i> -Daten
IRF	Interferon-regulierter Faktor
ISG	Interferon-stimuliertes Protein
ITGA	alpha-Integrin
ITGB	beta-Integrin
ITM	integrales Membranprotein
ITPKA	Inositol 1,4,5-Trisphosphat 3-Kinase A
JAK	Janus Kinase
JNK	Jun Kinase
K	Kontrolle
kDa	[Kilo Dalton]
KIF	Kinesin Familie
KREMEN2	Kringel-enthaltendes Transmembranprotein 2
LCB	<i>Lower Confidence Bound of the Fold Change</i>
MAPK	Mitogen-aktivierte Proteinkinase
MAPT	Mikrotubuli-assoziiertes Protein tau
MAS	<i>Microarray Analysis Suite</i> , Programm zur Normalisierung von <i>Microarray</i> -Daten
Me	Methyl
MHC	<i>Major Histocompatibility Complex</i> = Haupthistokompatibilitätskomplex
min	Minuten
M-Phase	Mitose-Phase des Zellzyklus
mTOR	<i>mammalian Target of Rapamycin</i>

MTT	3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromide
NAD ⁺	Nikotinamid-Adenin-Dinukleotid
NCAM	<i>Neuronal Cell Adhesion Molecule</i> = neuronales Zelladhäsionsmolekül
NUPR	<i>Nuclear Protein</i> = Kernprotein
NZK	Nierenzellkarzinom
OAS	2',5'-Oligoadenylat-Synthetase
OD	optische Dichte
P	Phosphat
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> = Phosphat gepufferte Kochsalzlösung
PCNA	<i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i> = proliferatives Zellkern-Antigen
PDGF	<i>Platelet-derived Growth Factor</i>
PE	Phycoerythrin
PI	Propidiumiodid
PI3K	Phosphatidylinositol-3-Kinase
PMSF	Phenylmethansulfonylfluorid
PPAR	<i>Peroxisome-Proliferator-activated Receptor</i> = Peroxisom-Proliferator-aktivierter Rezeptor
PS	Phospholipid-Phosphatidylserin
PTC	proximale Tubulusepithelzellen
PTEN	Phosphatase und Tensin homolog deletiert auf Chromosom 10
Rb	Retinoblastom
RGS	Regulator des G-Protein Signalwegs
RIN	RNA <i>integrity number</i> , gibt Auskunft über die RNA Qualität
RKI	Robert-Koch-Institut
RNA	Ribonukleinsäure (bzw. <i>-acid</i>)
rpm	<i>rounds per minute</i> = Umdrehungen pro Minute
RT	Raumtemperatur
RT-qPCR	<i>Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction</i> = Echtzeit quantitative Polymerasekettenreaktion
SAHA	Suberoyl-Anilid-Bishydroxamid
sec	Sekunden
Ser	Serin
SD	Standard

SDS	Natriumdodecylsulfat
SIRT1	Sirtuin 1, Homolog von Sir2
SOM	<i>Self-Organized Map Clustering</i>
S-Phase	Synthese-Phase, Zellzyklusphase, in der DNA-Replikation bzw. -Synthese stattfindet
SPON	Spondin
STAT	<i>Signal Transducer and Activator of Transcription</i>
Std	Stunden
T	Tage
Tab.	Tabelle
TEMED	Tetra-N-Methyl-Ethylendiamin
TGF- α	<i>Transforming Growth Factor α</i> = transformierender Wachstumsfaktor- α
Thr	Threonin
TLR	Toll-like Rezeptor
TNF	Tumor-Nekrose Faktor
TNN	Troponin
Tris	Tris-(Hydroxymethyl)-Methylamin
TSA	Trichostatin A
UE	Untereinheit
V	[Volt]
var	<i>Splicevariante</i>
Verd.	Verdünnung
VCAM	<i>Vascular Cell Adhesion Molecule</i> = vaskuläres Zelladhäsionsmolekül
VEGF	<i>Vascular Epidermal Growth Factor</i> = vaskulärer epidermaler Wachstumsfaktor
VHL	von Hippel-Lindau
VPA	Valproat bzw. Valproinsäure
Wnt3	<i>Wingless-type integration site family, member 3</i>
XIAF	XIAP-assoziiierter Faktor
XIAP	<i>X-linked Inhibitor of Apoptosis Protein</i> = X-gekoppelter Inhibitor des Apoptoseproteins

1 Einleitung

1.1 Das Nierenzellkarzinom

Das Nierenzellkarzinom (NZK) ist der häufigste maligne Tumor der Niere, ausgehend vom Epithel verschiedener Nephronabschnitte. Nach dem Ausgangsgewebe, den zytogenetischen Befunden und dem histologischen Bild wird zwischen dem klarzelligem (hypernephroiden, ca. 70-85 %), papillären (chromophilen, 10-15 %), chromophoben (ca. 5-10 %) und dem Ductus-Bellini-Karzinom (ca. 1 %) unterschieden (Oberneder et al. 2003, Pisani et al. 1993). Dem malignen NZK stehen etwa 5 % benigne Onkozytome gegenüber. Die Inzidenz des NZK steigt stetig an. Sie lag 2004 laut Robert-Koch-Institut bei 10-21/100.000 Menschen und erhöht sich um 2-6 % pro Jahr (www.rki.de 2008). Die Mortalität lag bei ungefähr 5-8/100.000 Menschen. In Deutschland wird 2009 durchschnittlich mit 14.000 (www.rki.de 2008), in den USA mit etwa 54.000 Neuerkrankungen (www.cancer.gov 2008) gerechnet. Der Erkrankungsgipfel liegt zwischen dem 60. und 70. Lebensjahr. Männer sind etwa doppelt so häufig betroffen wie Frauen. Nur wenige Patienten zeigen die klassischen Symptome wie Blut im Urin, Flankenschmerzen, eine tastbare Geschwulst im Oberbauch oder Veränderungen der Blutwerte, die dann zur Diagnose des NZK führen. Tatsächlich werden die meisten NZK zufällig bei Ultraschalluntersuchungen (Sonographie) oder in der Computertomographie (CT) entdeckt, die oft aus ganz anderen Gründen durchgeführt werden (www.urologenportal.de). Obwohl das NZK nur 3 % aller Tumorerkrankungen stellt, ist die Situation dramatisch. Da das NZK meist zufällig entdeckt wird, weisen 1/3 der betroffenen Patienten bereits bei der Erstdiagnose Fernmetastasen auf. Weitere 20-30 % der Patienten entwickeln im Verlauf der kurativen Therapie Metastasen. Eine Heilung ist in diesem Stadium meist nicht mehr möglich, da diese Tumoren in der Regel resistent gegen die vorhandenen Therapien (Chemo-, Radio- und Immuntherapie) sind. Es ist davon auszugehen, dass insgesamt 2/3 der Tumorpatienten an ihren Leiden versterben. Die 5 Jahres-Überlebensrate der Patienten mit metastasiertem NZK liegt dabei < 10 % (Motzer et al. 2000).

1.2 Molekulare Grundlagen des Nierenzellkarzinoms

Unter den malignen NZK ist das klarzellige NZK mit 70-85 % am stärksten vertreten. Es hat seinen Ursprung im proximalen Tubulus. Tumorzytogenetisch werden chromosomale Aberrationen wie der Fragmentverlust am Chromosom 3 beschrieben. Diese führen in etwa 50-75 % der klarzelligen NZK zu somatischen Mutationen im von Hippel-Lindau-Gen (VHL; Longo et al. 2007, Oberneder et al. 2003). Die biallele Inaktivierung des VHL, wie sie im NZK auftritt, verhindert die Degradierung des Hypoxie-induzierten Faktors-1 α (HIF-1 α , Kamura et al. 2000). Das aktive HIF-1 α translokiert in den Zellkern. Dort induziert HIF-1 α die Transkription von Wachstumsfaktoren, insbesondere des epidermalen Wachstumsfaktor-Rezeptors (EGFR) und des vaskulären epidermalen Wachstumsfaktors (VEGF, Bardos et al. 2004). EGFR und VEGF resultieren in einer Aktivierung des Phosphatidylinositol-3-Kinase (PI3K)/Akt/*mammalian target of rapamycin* (mTOR)- und des Ras/Raf/Mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-Signalwegs. Diese Signalwege sind maßgeblich in die Proliferation, Invasion und Angiogenese involviert (Longo et al. 2007, Paradis et al. 2000). Das NZK wird daher häufig auch als Angiogenese-abhängige Erkrankung bezeichnet. Im NZK ist die VEGF-Expression nachweislich erhöht (Tochizawa et al. 2008). Eine biallele VHL-Mutation kann somit fatale Folgen nach sich ziehen. HIF-1 α wird neben VHL jedoch ferner über Wachstumsfaktoren- und Zelladhäsions-Signalwege reguliert (Kim et al. 2004, Kamura et al. 2000, Herman et al. 1994, Latif et al. 1993). Eine entscheidende Rolle spielen dabei wie zuvor der PI3K/Akt/mTOR- und der Ras/Raf/MAPK-Signalweg. Tatsächlich ist der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg im NZK konstitutiv aktiviert (Robb et al. 2007, Sourbier et al. 2006). Dieser Signalweg ist dabei offensichtlich auch für die in NZK auftretenden Resistenzen gegenüber konventionellen Chemotherapien mit verantwortlich (LoPiccolo et al. 2008) und assoziiert mit einer verschlechterten Überlebensrate (Merseburger et al. 2008).

1.3 Derzeitige Therapien

Die Wahl der chirurgischen Maßnahmen und Therapien richtet sich nach dem Tumorstadium und der Funktion der Restniere.

Rechtzeitig erkannte, lokal begrenzte Tumore werden durch die komplette Entfernung der tumortragenden Niere (radikale Tumornephrektomie) oder durch eine organerhaltende Entfernung (Resektion) behandelt.

Problematisch ist das metastasierte NZK (fortgeschrittenes NZK). Beim Vorliegen von Fernmetastasen wird in der Regel eine Entfernung des Primärtumors vorgenommen. Additiv erfolgt die Entfernung der Metastasen oder die Bekämpfung dieser mittels adjuvanter und neoadjuvanter systemischer Therapien. Zu diesen zählt die postoperative Immuntherapie mit den Zytokinen Interleukin-2 und/oder Interferon-alpha (IFN-alpha). Die Zytokine aktivieren T-Zellen und natürliche Killerzellen. Dadurch soll das Immunsystem angeregt werden, seine Abwehr gegen das im Körper vorhandene Tumorgewebe zu richten. Interferon (IFN) kann ferner den *major histocompatibility complex class I* (MHC-I-Komplex) induzieren, die Proliferation und Angiogenese inhibieren sowie die Genexpression modulieren. Die Immuntherapie ist jedoch nur bei einer Minderheit der Patienten effizient (~15 %; Negrier et al. 2007, Fossa 2000) und ihre Wirksamkeit durch auftretende Resistenzen begrenzt (Oberneder et al. 2003, Fossa 2000). Generell ist diese Therapie mit starken Nebenwirkungen verbunden (Mancuso et al. 2005, Coppin et al. 2005, Oberneder et al. 2003).

Auch die Chemo- und Radiotherapie sind durch die Ausbildung von Resistenzen in ihrer Wirksamkeit limitiert und haben sich insgesamt beim NZK als wenig vielversprechend herausgestellt. Lediglich die Chemotherapie mit Vinblastin und 5-Fluorouracil konnte gewisse Therapieerfolge (max. 10 %ige Ansprechrate) erzielen (Longo et al. 2007, Oberneder et al. 2003). Die Hormontherapie muss ebenfalls als weitgehend unwirksam beim NZK angesehen werden, ihre Ansprechrate beträgt lediglich 2 % (Oberneder et al. 2003).

1.4 Molekulare Therapieansätze beim NZK

Die bisherigen Behandlungsoptionen beim NZK sind recht eingegrenzt. Neue Erkenntnisse der molekularen Grundlagen von Tumorgenese und -progression bilden die Voraussetzung für ein innovatives therapeutisches Lösungskonzept. Große Hoffnungsträger zur Behandlung fortgeschrittener NZK sind dabei molekular gezielte Therapieformen (*Targeted-Therapien*). Im Gegensatz zur unspezifisch wirkenden Chemotherapie sollen gezielte Therapeutika spezifisch die in der Tumorzelle außer Kontrolle geratenen molekularen Mechanismen korrigieren (*molecular Targeting*) und somit eine effektive und dabei wenig toxische Therapie ermöglichen. Auslöser für den Wandel in der Tumorthherapie war der Einsatz des ersten zielgerichteten Therapeutikums Imatinib, das den *platelet-derived* Wachstumsfaktor-Rezeptor (PDGFR, Bran et al. 2009), PDGF (Bran et al. 2009, Santini et al. 2007) und VEGF (Bran et al. 2009, Li et al. 2009) inhibiert. In präklinischen und klinischen Studien werden derzeit niedermolekulare Inhibitoren, insbesondere Tyrosinkinase- und mTOR-Inhibitoren sowie monoklonale Antikörper näher evaluiert. Sie wirken gezielt primären Zielstrukturen der Signalwege von Tumorzellen entgegen, die in Zellwachstum, Proliferation, Angiogenese und die Aktivierung von HIF involviert sind (Longo et al. 2007, Hudson et al. 2002). Wichtige Zielstrukturen sind dabei Rezeptortyrosinkinasen, insbesondere Komponenten des VEGF-, EGF-Rezeptor- und PI3K/Akt/mTOR-Signalwegs.

1.4.1 Tyrosinkinase-Inhibitoren

1.4.1.1 Sorafenib (Nexavar[®])

Sorafenib ist ein Tyrosinkinase-Inhibitor, der den VEGF-Rezeptor, ein Schlüsselprotein des Angiogenese-Signalwegs inhibiert. Weitere Proteine, wie z. B. der PDGF-Rezeptor und die Raf-1 bzw. Raf-Kinase werden blockiert (Merseburger et al. 2008a, Longo et al. 2007). Sorafenib wird daher häufig auch als Multikinase-Inhibitor bezeichnet. Sorafenib kann oral verabreicht werden. Eine Phase-I-Studie zeigte bei 34-36 % der Patienten mit soliden Tumoren über 6 Monate einen stabilen Krankheitsverlauf (Awada et al. 2005). Studien am metastasierten NZK nach vorangegangener Zytokinbehandlung wiesen eine Ansprechrate von 40 % auf, bei 30 % blieb der Krankheitsverlauf bis maximal 1 Jahr stabil (Ahmad et al. 2004). Im NZK mit zuvoriger IFN-alpha-Behandlung reduzierte Sorafenib die Tumorprogression um 56 % (Escudier et al. 2007a). Das progressionsfreie Überleben betrug 5,5 Monate nach Sorafenib-Behandlung gegenüber der Placebogruppe mit 2,8 Monaten. Das Langzeitüberleben war dabei von 14,3 auf 17,8 Monate erhöht (Bukowski et al.

2007). In einer Erstlinien-Vergleichsstudie mit Sorafenib und IFN-alpha konnte jedoch trotz verbesserter Reduktion des Tumolvolumens und der Lebensqualität nach Sorafenib-Gabe kein signifikanter Unterschied im progressionsfreien Überleben gegenüber IFN-alpha detektiert werden (Escudier et al. 2009). Sorafenib ist in Deutschland bisher als Zweitlinienbehandlung oder bei Patienten, die für eine Zytokinbehandlung nicht in Frage kommen, zugelassen (Merseburger et al. 2008a).

1.4.1.2 Sunitinib (Sutent®)

Sunitinib ist ein Tyrosinkinase-Inhibitor, der seine anti-tumorale Wirkung u. a. durch die Inhibition von PDGFR und VEGFR entfaltet. In einer Zweitlinientherapie im Rahmen einer Phase-II-Studie an Patienten mit metastasiertem NZK zeigte Sunitinib bei 34-40 % der Fälle ein partielles Ansprechen. Bei 27-29 % dieser Patienten blieb der Krankheitsverlauf dabei über 3 Monate stabil (Motzer et al. 2006a, 2006b). In einer weiteren Studie konnte nach anti-angiogener Therapie die Applikation mit Sunitinib oder Sorafenib eine signifikante anti-tumorale Aktivität induzieren (Tamaskar et al. 2008). Eine Phase-III-Studie verglich Sunitinib und IFN-alpha an 750 unbehandelten Patienten mit metastasiertem NZK (gute und intermediäre Prognose, Motzer et al. 2007). Diese zeigte eine höhere Ansprechrate im Sunitinib-Arm (31 % versus 6 % im Interferon-Arm). Des Weiteren war das progressionsfreie Überleben für die mit Sunitinib-behandelten Patienten länger (11 Monate versus 5 Monate mit IFN-alpha). Sunitinib ist in Deutschland als Erst- und Zweitlinientherapie für das metastasierte NZK zugelassen (Merseburger et al. 2008a).

1.4.2 mTOR-Inhibitoren

1.4.2.1 Temsirolimus (Torisel®)

Temsirolimus, ein Derivat des Immunsuppressivums Rapamycin, inhibiert die mTOR-Kinase. In einer Phase-III-Studie an *high risk* NZK-Patienten konnte ein signifikanter Vorteil von Temsirolimus (11 Monate) versus IFN-alpha (7 Monate) bezüglich des Langzeitüberlebens nachgewiesen werden (Hudes et al. 2007). Die Kombination der beiden Substanzen zeigte jedoch keinen weiteren Effekt gegenüber der Temsirolimus Monotherapie. Temsirolimus ist in Deutschland für alle metastasierten NZK zugelassen.

1.4.2.2 RAD001 (Everolimus, Afinitor®)

RAD001 ist ein weiterer mTOR-Inhibitor. RAD001 kann oral appliziert werden. In einer Phase-II-Studie an 41 Patienten mit metastasiertem NZK konnte für ca. 70 % der Patienten ein medianes progressionsfreies Überleben von über 6 Monaten nach RAD001-Behandlung nachgewiesen werden (Amato et al. 2009). RAD001 wird voraussichtlich im Sommer 2009 zur Therapie beim NZK zugelassen.

1.4.3 Antikörpertherapie

1.4.3.1 Bevacizumab (Avastin™)

Das NZK ist häufig durch einen erhöhten Gehalt an zirkulierendem VEGF gekennzeichnet. Bevacizumab ist ein monoklonaler Antikörper mit hoher Bindungsaffinität zu VEGF. Durch die Bindung an VEGF wird dieses für die Interaktion mit dem korrespondierenden VEGF-Rezeptor blockiert. Die Kombination einer Chemotherapie mit Bevacizumab resultierte beim Kolonkarzinom in einem signifikant verlängerten Gesamtüberleben (Hicklin et al. 2005). Eine Studie am fortgeschrittenem NZK mit Bevacizumab wurde in der Interimsphase gestoppt, nachdem sich die progressionsfreie Zeit gegenüber der Placebogruppe auf das 2,6-fache erhöht hatte (Yang et al. 2003). In einer Phase-III-Studie mit kombinierter Applikation von Bevacizumab und IFN-alpha zeigte sich ein progressionsfreies Überleben von 10 Monaten versus 5 Monaten im IFN-Placebo-Arm (Escudier et al. 2007b). Die Applikation mit Bevacizumab wies dabei jedoch eine deutlich höhere Toxizität und stärkere Nebenwirkungen gegenüber IFN-alpha auf. In Deutschland ist Bevacizumab für die Therapie beim metastasierten NZK zugelassen.

1.4.4 Histondeacetylase-Inhibitoren

Insgesamt sind die neuen zielgerichteten Therapien zum jetzigen Zeitpunkt trotz der z. T. ermutigenden klinischen Daten noch als rudimentär einzuschätzen (Merseburger et al. 2008a). So resultieren die genannten Therapien lediglich in einer partiellen Ansprechrates und ihre Wirkung ist aufgrund der sich im Verlauf der Therapien bildenden Resistenzen stark limitiert (Coppin et al. 2008, Longo et al. 2007). Durch den Einsatz von Kombinationen der zielgerichteten Agenzien erhoffte man sich eine Verbesserung der Wirksamkeit (Kerbel et al. 2002). Die mehrfache Blockade von Signalwegen sollte dabei die Entstehung von kompensatorischen Rückkopplungsschleifen vermeiden (horizontale und vertikale Blockade, Longo et al. 2007). Erste Kombinationstherapien erwiesen sich jedoch bisher als nicht erfolgreich (Baselga et al. 2007, Bukowski et al. 2007, Longo et al. 2007).

Mittlerweile wird postuliert, dass die epigenetische Modulation des NZK, einen innovativen, effizienten und viel versprechenden Ansatz darstellen könnte. So sind maligne Transformationen generell durch Aberrationen der epigenetischen Kontrollmechanismen gekennzeichnet, d. h. Veränderungen die nicht auf den Genen selbst beruhen, wie z. B. bei Genmutationen, sondern vielmehr auf Faktoren, die die Zugänglichkeit der Gene beeinflussen (Duenas-Gonzalez et al. 2008, Lui et al. 2006, Bolden et al. 2006, Hanahan et al. 2000). Epigenetische wirkende Substanzen sind somit maßgeblich in die Regulation der Genexpression involviert. Sie induzieren eine Konformationsänderung der DNA, die in einem transkriptional aktiven oder inaktiven Status des Chromatins resultieren kann (Robertson et al. 2001, Marks et al. 2000). Die Histonacetylierung und DNA-Methylierung sind charakteristische epigenetische Modifikationen (Santini et al. 2007, Das et al. 2004, Santini et al. 2001). Tatsächlich konnte in den unterschiedlichsten Tumoren eine Überexpression von Histondeacetylasen (HDACs), eine damit einhergehende Hypoacetylierung der Histone und Deaktivierung der Genexpression nachgewiesen werden (Wilson et al. 2006, Bolden et al. 2006, Zhang et al. 2005, 2004, Zhu et al. 2004, Halkidou et al. 2004). Da epigenetische Modifikationen potentiell reversibel sind, repräsentieren HDACs viel versprechende Ziele für innovative Therapieansätze.

1.4.4.1 Funktion der Histonacetyltransferasen und Histondeacetylasen

Die DNA eukaryotischer Zellen liegt in Form des verdichteten Chromatins im Zellkern vor. Histone spielen eine entscheidende Rolle bei der lokalen Konformationsänderung und damit der sterischen Anordnung des Chromatins, die die Zugänglichkeit der DNA und somit die transkriptionale Aktivität der Gene maßgeblich beeinflusst. Die N-terminalen Regionen der Histone sind dabei Angriffspunkte für verschiedenste posttranslationale Modifikationen (Wu et al. 2000). Insbesondere das dynamische Gleichgewicht zwischen Acetylierung und Deacetylierung ist dabei von Bedeutung. Es wird von zwei kompetitiven Enzymfamilien, den Histonacetyltransferasen (HATs) und Histondeacetylasen (HDACs), reguliert (Robertson et al. 2001, Marks et al. 2000). Die Acetylierung der Histone wird durch HATs katalysiert. Durch die negativ geladenen Acetylgruppen erhalten die Histone eine negative elektrische Ladung. Diese führt zur „Abstoßung“ der ebenfalls negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA und korreliert mit verringerter DNA-Packungsdichte (Euchromatin, Abb. 1A) und erhöhter transkriptionaler Aktivität. HDACs hingegen induzieren die Abspaltung der negativ geladenen Acetylgruppen. Die Histonenden sind dadurch positiv geladen und gehen eine enge Bindung mit

den negativ geladenen Phosphatgruppen der DNA ein. Dies resultiert in einer kondensierten Chromatinstruktur (Heterochromatin, Abb. 1B) und Repression der Transkription.

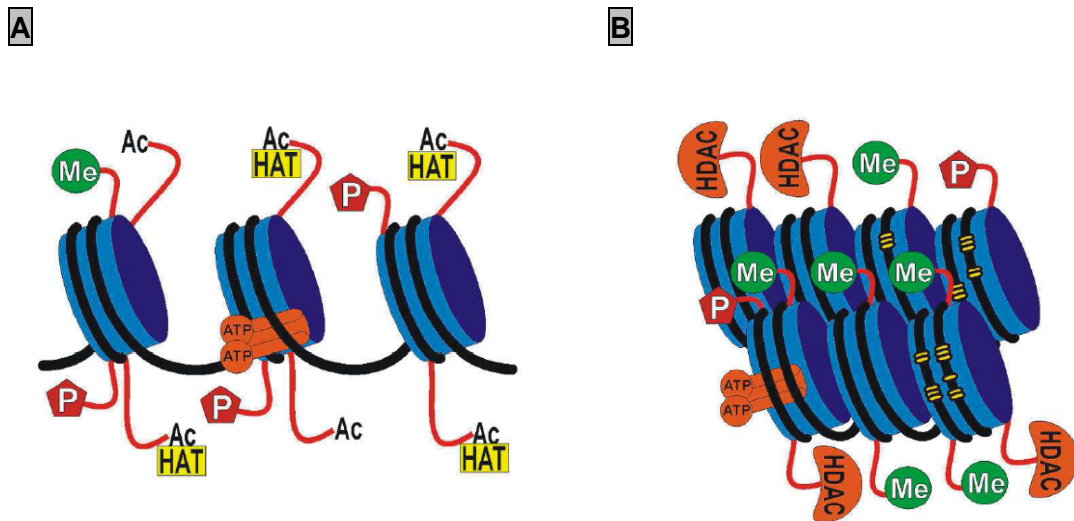


Abbildung 1: Konformationen des Chromatins in Abhängigkeit der Histonmodifikationen, wie Phosphorylierung (P), Methylierung (Me) und Acetylierung (Ac). **A** Die Acetylierung der Histone führt zu einer dekondensierten Chromatinstruktur, verbunden mit transkriptionaler Aktivität. **B** Die Deacetylierung der Histone löst die Kondensation des Chromatins aus, einhergehend mit der Repression der Gentranskription.

Wird dieses Gleichgewicht zwischen HATs und HDACs gestört, ist ihre transkriptionale Kontrollfunktion außer Kraft gesetzt und es kommt zu pathologischen Veränderungen, wie der Entstehung maligner Tumorerkrankungen.

1.4.4.2 HDAC-Aktivität in malignen Tumorentitäten

In einer Vielzahl der Tumoren konnte eine dramatische Überexpression von HDACs, und die damit einhergehende Hypoacetylierung und Genblockade beobachtet werden (Wilson et al. 2006, Bolden et al. 2006, Zhang et al. 2005, 2004, Zhu et al. 2004, Halkidou et al. 2004). Die Transkription regulatorischer Proteine, die wichtige Funktionen in der Zellzykluskontrolle oder Apoptose einnehmen, wird durch HDACs unterdrückt. Da die Repression der Gene auf der Rekrutierung der HDACs beruht, ist dieser Prozess reversibel und kann durch HDAC-Inhibitoren invertiert werden. HDAC-Inhibitoren repräsentieren damit eine viel versprechende Gruppe epigenetischer Modulatoren für den pharmakologischen Angriff auf HDACs.

1.4.4.3 HDAC-Klassen

HDACs zählen zu einer hoch konservierten Enzymfamilie, die in Eu- und Prokaryoten vorkommen. Sie werden entsprechend ihrer Sequenz- und Domänenverwandtschaft in 4 Klassen unterteilt. Klasse I, II und IV sind miteinander nah verwandte, Zink-abhängige Deacetylasen. HDAC-Klasse III ist im Gegensatz zu den übrigen HDACs NAD⁺-abhängig.

Klasse I: HDAC1, 2, 3 und HDAC8

Klasse IIa: HDAC4, 5, 7 und HDAC9

Klasse IIb: HDAC6 und HDAC10

Klasse III: SIRT1-7 (Homologe des SIR2 Proteins der Hefe *Saccharomyces cerevisiae*)

Klasse IV: HDAC11

Klasse I HDACs sind im Zellkern angesiedelt. Sie modulieren die Proliferation und Apoptose von Zellen. Klasse II HDACs besitzen die Fähigkeit der Translokation zwischen Kern und Zytoplasma. Sie sind offensichtlich relevant für Zellreifung und -differenzierung. Klasse III HDACs deacetylieren hauptsächlich zytoplasmatische Proteine. Das Klasse IV HDAC wird im Gegensatz zu den anderen HDAC-Klassen lediglich in eukaryotischen Organismen Gewebe-spezifisch exprimiert (Santini et al. 2007).

1.4.4.4 HDAC-Inhibitoren

HDAC-Inhibitoren rufen durch die Interaktion mit der katalytischen Domäne der HDACs eine Hemmung der enzymatischen Aktivität hervor. Die daraus resultierende Histon-Hypoacetylierung und Reaktivierung der Transkription blockierter Gene korreliert mit der Induktion von Zelldifferenzierung, Apoptose, Zellzyklusregulation und Expression von Tumorsuppressoren sowie Proliferations- und Angiogenese-Inhibition. Die HDAC-Inhibitoren weisen dabei allgemein eine geringe Toxizität gegenüber normalen, nicht malignen Zellen auf (Carew et al. 2008, Liu et al. 2006, Kelly et al. 2005, Johnstone 2002, Marks et al. 2001). Frühe klinische Studien mit HDAC-Inhibitoren führten zur Remission der Tumore und verbesserter Symptomatik in stark vorbehandelten und mehrfach rückfällig gewordenen Patienten, bei überraschend geringen Nebenwirkungen (Kelly et al.

2005, Johnstone 2002). Eine Vielzahl heterogener Substanzen ist in der Lage, Histondeacetylasen zu binden und durch die Blockade ihrer enzymatischen Aktivität eine Hyperacetylierung der Histone zu bewirken. Aufgrund ihrer biochemischen Struktur werden HDAC-Inhibitoren wie folgt klassifiziert (Tab. 1):

Klasse	Substanzen	IC ⁵⁰ -Bereich
kurzkettige Fettsäuren	Butyrat, Valproat (VPA), Pivaloyloxymethyl-Butyrat (Pivanex, AN9), 4-Phenylbutyrat	µM - mM
Hydroxamsäuren	Trichostatin A (TSA), Suberoyl-Anilid-Bishydroxamid (SAHA), NVP-LAQ-824, Scriptaid, Oxamflatin, Pyroxamid	nM - µM
Epoxide	Trapoxin A, Depudecin	nM - µM
andere Tetrapeptide	Apicidin, Depsipeptide (FK228)	nM - µM
Benzamide	MS-275, N-Acetyldinaline (CI-994)	µM
Hybridmoleküle	CHAP31, CHAP50	nM

Tabelle 1: Klassen der HDAC-Inhibitoren: Angaben der zugehörigen Substanzen dieser Klassen und des in vitro IC⁵⁰-Bereichs.

Viele HDAC-Inhibitoren weisen die Fähigkeit auf, die Effizienz von konventionellen Chemotherapeutika synergistisch zu verstärken (Carew et al. 2008, Glaser et al. 2007, Arnold et al. 2007, Rikiishi et al. 2007, Bolden et al. 2006, Dowdy et al. 2006, Fuino et al. 2003, Kim et al. 2003). Des Weiteren konnten HDAC-Inhibitoren Resistenzen des NZK aufheben (Wang et al. 2005). Die günstige Toxizität der HDAC-Inhibitoren und ihre synergistische Wirkung auf die anti-tumorale Aktivität vieler Therapeutika in vitro und in vivo verdeutlichen ihr viel versprechendes Potential bei malignen Tumorerkrankungen.

1.4.4.5 Valproat

Die kurzkettigen Fettsäuren, zu denen Butyrat und Valproat (VPA, Abb. 2) gehören, zeigen trotz vergleichsweise höherer notwendiger Konzentration (im millimolaren Bereich) ein äußerst günstiges Toxizitätsprofil in vivo. In der stetig wachsenden Gruppe von HDAC-Inhibitoren zeigt die kurzkettige Fettsäure VPA deutliche Vorteile im Vergleich zu anderen Inhibitoren. VPA ist ein allgemein gut verträgliches Medikament, das für die Epilepsitherapie in der Klinik bereits etabliert ist. Sein günstiges Sicherheitsprofil wurde durch die *U.S. Food and Drug Administration*

bestätigt. VPA kann oral appliziert werden, mit einer adäquate Pharmakokinetik in vivo (Halbwertszeit: 7-16 Stunden, Blaheta et al. 2002).

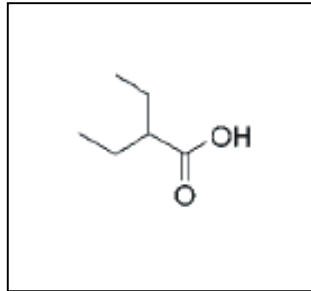


Abbildung 2: Strukturformel von Valproat.

1997 konnten erstmals VPA Eigenschaften als Anti-Tumoragens an neuroektodermalen Tumorzellen am Tiermodell in vivo aufgezeigt werden. Dabei wurde das Tumorzellwachstum signifikant gehemmt (Cinatl et al. 1997). Des Weiteren konnte ein drastischer Verlust der Adhäsions- und transendothelialen Migrationskapazität bei VPA-behandelten neuroektodermalen Tumorzellen beobachtet werden (Cinatl et al. 2002). VPA führte dabei zu einer Stabilisierung der Tumorzellaggregate und verminderten Ablösung von Einzelzellen. Der Effekt wurde primär über eine Modulation von Adhäsionsrezeptoren verursacht, deren Expressionsdichte invers mit dem metastatischen Potential der Tumorzellen korrelierte (Beecken et al. 2005, Blaheta et al. 2004a, Blaheta et al. 2002, Cinatl et al. 2002). Auch die Gefäßendothelien erfahren durch VPA eine charakteristische Veränderung. So wird ihr Wachstum und ihre Migration inhibiert, was in der Folge zur Angiogenese-Hemmung führt (Michaelis et al. 2004). Mittlerweile konnte gezeigt werden, dass VPA anti-tumorale Effekte in einer Vielzahl von in vitro und in vivo Systemen induziert. Dabei moduliert es multiple Signalwege, involviert in Zellzyklusarrest, Apoptose, Angiogenese, Metastasierung, Differenzierung, Seneszenz und Tumormunität (Duenas-Gonzalez et al. 2008, Blaheta et al. 2005, 2002, Phiel et al. 2001, Göttlicher et al. 2001). 2001 wurde die Kausalität zwischen den anti-kancerogenen Eigenschaften der Substanz und der Inhibition von HDACs hergestellt (Göttlicher et al. 2001, Phiel et al. 2001). Dabei inhibiert VPA HDACs der Klasse I und IIa (siehe Punkt 1.4.4.4), wie Gurvich mittels eines speziellen *Screening*-Verfahrens für HDAC-Inhibitoren nachweisen konnte (Gurvich et al. 2004). Im Hinblick auf die Resistenzentwicklung spielt VPA ebenfalls eine entscheidende Rolle. So konnte gezeigt werden, dass VPA Resistenzen zu umgehen und das maligne Potential chemoresistenter Tumorzellen deutlich zu reduzieren

vermag (Lin et al. 2008, Blaheta et al. 2007, Tang et al. 2004). VPA selbst hingegen zeigt nur geringe Tendenzen, Resistenzen auszulösen (Fedier et al. 2007). Derzeit befindet sich die Substanz in der Klinik in Phase-I-Studien solider Tumorentitäten (Munster et al. 2007, Atmaca et al. 2007).

1.4.5 Kombinationstherapie: VPA + Interferon-alpha

Die Steigerung der Sensitivität gegenüber HDAC-Inhibitoren durch die Kombination mit anderen anti-neoplastischen Agenzien wurde mehrfach als äußerst viel versprechend angesehen (Carew et al. 2008, Kuljaca et al. 2007, Glaser et al. 2007, Arnold et al. 2007, Rikiishi et al. 2007, Bolden et al. 2006, Dowdy et al. 2006, Fuino et al. 2003, Kim et al. 2003). Frühe Studien geben erste Hinweise, dass die Zugabe des Zytokins IFN-alpha (Abb. 3) eine Wirkungssteigerung der VPA-Effekte induzieren könnte. Tatsächlich ist bekannt, dass IFN-alpha anti-tumorale Eigenschaften verschiedener Agenzien zu steigern vermag. Untersuchungen belegen die Wirkungsverstärkung einer IFN-alpha/Vinblastin-Kombinationstherapie beim NZK im Vergleich zur Vinblastin-Monotherapie (Pyrhönen et al. 1999). Die Kombination von IFN-alpha mit Sorafenib induzierte in NZK-Zellen eine deutlichere Proliferations-Hemmung als die Sorafenib-Monotherapie (Tochizawa et al. 2008). Interessant sind Daten, die zeigen, dass IFN-alpha die Wirkung von HDAC-Inhibitoren erhöhen kann. Bereits 1996 konnte durch die additive Gabe von IFN-alpha zu Butyrat die anti-proliferativen Effekte in vitro und in vivo in Lungen-Adenokarzinomzellen verstärkt werden (Goto et al. 1996). Studien an Melanomzellen resultierten nach Applikation der HDAC-Inhibitoren TSA und VPA mit IFN-alpha in einer signifikanten Steigerung pro-apoptotischer Effekte im Vergleich zur Monotherapie mit den entsprechenden HDAC-Inhibitoren (Krämer et al. 2005). In ähnlichen Untersuchungen an Neuroblastomzellen bewirkten die HDAC-Inhibitoren TSA und VPA, jeweils kombiniert mit IFN-alpha, eine stärkere Induktion des Zellzyklusarrestes sowie Hemmungen der Invasion und Angiogenese als die Einzelanwendungen der Substanzen (Kuljaca et al. 2007, Michaelis et al. 2004a). Weitere Studien belegen synergistische anti-tumorale Effekte der Kombinationstherapie mit HDAC-Inhibitoren und IFN-alpha auch im Tiermodell. Kuljaca et al. zeigte, dass IFN-alpha sowohl in vitro als auch in vivo ein potenter Kombinationspartner von HDAC-Inhibitoren ist (Kuljaca et al. 2007). Erstaunlicherweise verstärkt IFN-alpha vor allem dann das anti-tumorale Potential von Therapeutika, wenn es in sub-therapeutischer Dosis verabreicht wird, die für sich genommen keine Wirkung erzielt (Lee et al. 2006, Cinatl et al. 2002, Lucero et al. 2001, Okamoto et al. 1996).

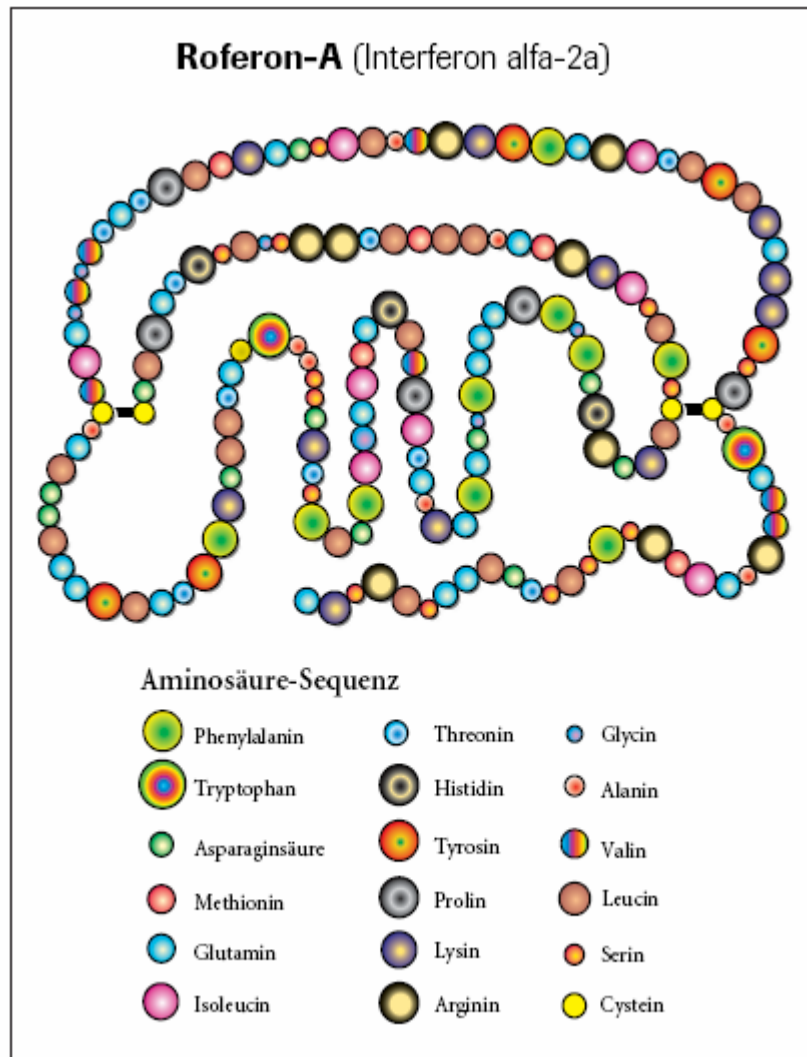


Abbildung 3: Aminosäuresequenz des IFN-alpha-2a: IFN-alpha besteht aus 165 Aminosäuren. Durch 2 Disulfidbrücken an je zwei Cysteinen erhält es seine charakteristische 3-dimensionale Struktur. Die Struktur ist entscheidend für seine biologischen Eigenschaften und Wirkungsweise. IFN-alpha wird natürlicherweise von Leukozyten produziert. Für die Gewinnung als Medikament wird es heute hauptsächlich gentechnisch hergestellt (www.roche.com).

1.5 Aufgabenstellung

Im Rahmen der vorliegenden Arbeit wird postuliert, dass der HDAC-Inhibitor VPA anti-tumorale Effekte im NZK induzieren kann. Darüber hinaus wird postuliert, dass die additive Gabe niedrig dosierten IFN-alphas zu einer Wirkungsverstärkung von VPA führt.

Im Fokus der vorliegenden Dissertation standen daher präklinische Studien zur Etablierung einer VPA Mono- und Kombinationstherapie von VPA mit IFN-alpha beim NZK. Folgende Fragestellungen sollten in diesem Vorhaben evaluiert werden:

- Welchen Einfluss zeigt die VPA-Applikation auf Wachstum und Adhäsion des NZK?
- Resultiert die additive Gabe von IFN-alpha in einer Verstärkung der anti-tumoralen Effekte von VPA?
- Welche molekularen Mechanismen liegen den biologischen Effekten zugrunde?

Der Einfluss von VPA auf die Tumorzellmalignität wurde dabei anhand verschiedener NZK-Zelllinien mittels funktioneller Untersuchungen der Proliferations- und Adhäsionsdynamik überprüft. Fluorimetrische und molekularbiologische Studien dienten der Aufklärung relevanter molekularer Mechanismen der durch VPA- und IFN-alpha-induzierten Veränderungen. Um die Untersuchungen translational zu gestalten, wurden zudem Studien am Tiermodell vorgenommen.

2 Material

2.1 Apparaturen

Agarosegeldokumentation	Gel Doc 1000, BioRad (München)
Agarosegelkammer	HORIZON 11.14, Gibco (Karlsruhe)
Bioanalyser	Agilent 2100 Bioanalyser, Agilent Technologies (Waldbronn)
Brutschrank für Zellkulturen	Heraeus Holding GmbH (Hanau)
Durchflusszytometer	FACScan, Becton Dickinson (Heidelberg)
Entwicklermaschine	Typ Unix 60, AGFA (Köln)
<i>GeneChip Array Station</i>	Affymetrix, Inc. (USA)
<i>GeneChip HT Array Plate Scanner</i>	Affymetrix, Inc. (USA)
Heizblock	Thermoblock TB1, Biometra (Göttingen)
Homogenisierer	GLH-220, OMNI International/BioLab Products GmbH (Godenstorf)
Hybridisierungssofen	CheChip <i>Hybridization Oven</i> 640, Affymetrix (USA)
Lichtmikroskop	PhotomikroskopIII, Zeiss (Jena)
Magnetrührer	Kika Labortechnik (Staufen)
Nanodrop	nanodrop ND1000, PeqLab Biotechnology GmbH (Erlangen)
Netzgerät	PowerPac 300 Power Supply, Biorad (München)
Pipettierhilfe	Biohit (Helsinki, Finnland)
Protein-Minigel-Apparaturen	Biorad (München)
Protein-Transfer-Apparaturen	Biorad (München)
Wasserbad	GRW 720-04, Fritz Gössner GmbH & Co. (Hamburg)
SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese	BIORAD Mini Protein II Apparatur, Biorad (München)
Spektrophotometer	UVIKON 933, Bio-Tek Kontron Instruments (Neufahrn) <i>Spectra Max 190</i> , Molecular Devices (USA)
Sterilbank	antair _{BS} , W.H. Mahl (Kaarst)

<i>Thermocycler</i>	TRIO-Thermoblock™, Biometra (Göttingen) für Real Time qPCR: Mx3005p, Stratagene (Amsterdam, Niederlande)
Tischschüttler	Polymax 1040, Heidolph (Schwalbach)
Transilluminator	FluorChem™ 8900, Alpha Innotech (USA)
Waagen	Typ S-234, Denver Instrument GmbH (Göttingen) Typ SI-8001, Denver Instrument GmbH (Göttingen)
Zentrifugen	Typ 5402, Eppendorf (Hamburg) Rotanta/RP, Hettich (Tuttlingen) Suprafuge 22, Heraeus (Osterode)

2.2 Verbrauchsmaterial

<i>AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit</i>	Stratagene (Amsterdam, Niederlande)
<i>Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I</i>	Becton Dickinson Biosciences (Pharmingen)
<i>Blotting-Papiere</i>	Typ GB002, Schleicher & Schuell (Dassel)
<i>Cell Proliferation Kit I (MTT)</i>	Colorimetrisches Assay (MTT basierend), Roche Diagnostics GmbH (Penzberg)
<i>CycleTEST™ PLUS DNA Reagent Kit</i>	Becton Dickinson (Heidelberg)
DC-Protein-Assay	Biorad (München)
Deckgläser	Menzel-Gläser (Braunschweig)
Einmalpipetten, steril (1, 5, 10 und 25 ml)	Costar Corning (USA)
FACS-Röhrchen	Falcon (Heidelberg)
Filterpapier	VWR International (Darmstadt)
<i>GeneChip HT Human Genom U133 Array Plate Set</i>	Affymetrix, Inc. (USA)
<i>GeneChip Hybridization, Wash and Stain Kit</i>	Affymetrix, Inc. (USA)
<i>HDAC Colorimetric Assay/Drug Discovery Kit</i>	<i>Color de Lys Assay System</i> , Biomol GmbH (Hamburg)

<i>Human active Caspase-3 Immunoassay</i>	Quantikine, R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt)
Kryoröhrchen (2 ml)	nunc™ CryoTube™ Vials, Apogent, Nunc A/S (Roskilde, Dänemark)
Nitrozellulosemembran	Hybond-C Extra, Amersham Bioscience UK Ltd. (Bucks, UK)
Neubauer-Zählkammer	W. Schreck (Hofheim/TS)
Pipetten	MicroOne, Starlab (Ahrensberg)
Pipettenspitzen(10, 200, 1.000 µl)	Starlab (Ahrensburg)
Poly-D-Lysin 24-Well-Platten	Becton Dickinson (Heidelberg)
Polystyrolzellkulturflaschen, steril (12,5 cm ² , 25 cm ² , 75 cm ² Wuchsfläche)	Sarstedt (Nürmbrecht)
QIAshredder™ (250)	Qiagen (Hilden)
Reaktionsgefäße (1,5 ml)	Eppendorf (Hamburg)
RNA 6000 Nano Kit	Agilent Technologies Deutschland GmbH (Waldbronn)
RNAesy Mini Kit (250)	Qiagen (Hilden)
RNase-Free DNase Set	Qiagen (Hilden)
Röntgenfilm	Typ Hyperfilm™ECL™, Amersham-Buchler (Braunscheig)
RT ² qPCR Primer Assays	SuperArray Bioscience Corporation (USA), Vertrieb: Biomol
Schwammtücher	Biorad (München)
Sterilfilter (250ml & 500 ml, 0,22 µm)	Millipore (Schwalbach)
Western Blot Recycling Kit	Stripping, Alpha Diagnostic (USA)
Zellkulturplatten (6, 24, 96 Wells)	Sarstedt (Nürmbrecht)
Zentrifugenröhrchen (15, 50 ml)	PP-Test tubes, Falcon (Heidelberg)

2.3 Chemikalien und Agenzien

Accutase	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
Agarose Gel Loading Dye	6 x, Boston Bio Products (USA)
Albumin	aus Rinderserum (BSA), Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Ammoniumperoxodisulfat (APDS)	Merck KGaA (Darmstadt)
Aprotinin	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Acrylamidlösung (30 %)	Carl Roth GmbH & Co. (Karlsruhe)

Bisacrylamidlösung (2 %)	Carl Roth GmbH & Co. (Karlsruhe)
Chemolumineszenz-Lösung (ECL)	Amersham-Buchler (Braunscheig)
Chlormethylbenzamid	CellTracker CM-Dil (C-7000), Molecular Biologische Technologie (Göttingen)
Destilliertes Wasser (Aqua dest.)	B. Braun Melsung AG (Melsungen)
Dimethylsulfoxid (DMSO)	Merck KGaA (Darmstadt)
Dispase	Sigma-Aldrich GmbH (Taufkirchen)
DNase	Qiagen (Hilden)
DTT	Becton Dickinson (Heidelberg)
Ethanol (99 % EtOH)	Apotheke des Klinikums der Goethe- Universität (Frankfurt/Main)
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Fibronektin	Becton Dickinson (Heidelberg)
<i>First Strand Buffer</i> (5 x)	Becton Dickinson (Heidelberg)
Formaldehydlösung (10 %)	Carl Roth GmbH & Co. (Karlsruhe)
Glutaraldehyd	Merck KGaA (Darmstadt)
Glycerin (= Glycerol)	Carl Roth GmbH & Co. (Karlsruhe)
Glycin	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Harnstoff (Urea)	Carl Roth GmbH & Co. (Karlsruhe)
HBSS	<i>Hanks Balanced Salt W/O Phenol Rad</i> , Gibco/Invitrogen (Karlsruhe)
Interferon alpha-2a (Roferon-A)	Roche Diagnostics GmbH (Mannheim)
Isobutanol	Fluka Chemie AG (Buchs, Schweiz)
Kaliumchlorid (KCl)	Merck KGaA (Darmstadt)
Kollagen-G (4 mg/ml)	aus Kälberhaut, Biochrom AG (Berlin)
<i>Laemmli Sample Puffer</i>	Biorad (München)
Laminin	Becton Dickinson (Heidelberg)
Leupeptin	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Magermilchpulver	Töpfer GmbH (Dietmannsried)
Magnesiumchlorid (MgCl ₂)	Merck KGaA (Darmstadt)
Methanol	J.T. Backer (Deventer, Holland)
Mercaptoethanol	Merck KGaA (Darmstadt)
Natriumchlorid (NaCl)	Sigma-Aldrich GmbH (Seelze)
Natriumdeoxycholat (Na-)	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Natriumdodecylsulfat (SDS)	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Natriumfluorid (NaF)	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Natriumorthovanadat (Na ₃ VO ₄)	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)

Natriumpyrophosphat	Merck KGaA (Darmstadt)
PBS ⁺ (mit CaCl ₂ und MgCl ₂)	<i>Dulbeccos Phosphate Buffered Saline</i> , Gibco/Invitrogen (Karlsruhe)
PBS ⁻ (ohne CaCl ₂ und MgCl ₂)	<i>Dulbeccos Phosphate Buffered Saline</i> , PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
Pepstatin	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
peqGOLD Protein-Marker IV	<i>prestained</i> , PeqLab Biotechnologie GmbH (Erlangen)
Phenylmethylsulfonylfluorid (PMSF)	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Proleukin	Interleukin-2 ähnlich, Chiron GmbH (München)
Tergitol NP40	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Tetramethylethyldiamin (TEMED)	Carl Roth GmbH & Co. (Karlsruhe)
Trypsin-EDTA (1 x)	PAA Laboratories GmbH (Pasching, Österreich)
Tween 20	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat, AppliChem GmbH (Darmstadt)
Tris (ultrapure)	AppliChem GmbH (Darmstadt)
Triton X-100	Schwarz/Mann Biotech, ICN Biomedicals (USA)
Trypanblau	Gibco/Invitrogen (Karlsruhe)
Valproinsäure (VPA)	Natriumvalproat, G.L. Pharma GmbH (Lannach, Österreich)
Waschpuffer A und B	für <i>Microarrays</i> , Affymetrix, Inc. (USA)

2.4 Nährmedien

2.4.1 Nährlösungen und Zusätze

Medium 199 (M199)	Gibco/Invitrogen (Karlsruhe)
RPMI 1640 Medium	+ L-Glutamin, Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)
Endothelialer Zellwachstumsfaktor (ECGS)	PromoCell GmbH (Heidelberg)
Fötales Rinderserum	<i>Foetal Bovine Serum</i> (FBS), Hitzeinaktiviert, Gibco/Invitrogen (Karlsruhe)
Gentamycin (50 mg/ml)	Gentamycin Sulfate, BioWhittaker™ (Verviers, Belgien)

Glutamin	GlutaMAX™, Gibco/Invitrogen (Karlsruhe)
Hepes Puffer (1 M)	Carl Roth GmbH & Co. (Karlsruhe)
Humanes Serum	Blutspendedienst des Deutschen Roten Kreuzes (Frankfurt/Main)
Heparin (5.000 I.E./0,2 ml)	Heparin-Natrium-5.000-ratiopharm, Ratiopharm (Ulm)
Penicillin/Streptomycin (5.000 U/ml)	Gibco/Invitrogen (Karlsruhe)

2.4.2 Zusammensetzung

2.4.2.1 M199

Für die Kultivierung humaner Endothelzellen (HUVEC):

Grundmedium:	500,0 ml	Medium 199
	10,0 ml	Hepes Puffer (1 M)
	0,2 ml	Heparin (5.000 I.E.)
	1,0 ml	Gentamycin (50 mg)
Nährmedium (500ml):	396,0 ml	Grundmedium
	50,0 ml	FBS
	50,0 ml	Humanserum

Steril filtriert im Sterilcup/Steriltop, danach erst Zugabe von:

4,0 ml	ECGF
--------	------

2.4.2.2 RPMI 1640

Für die Kultivierung von Tumorzellen:

Nährmedium:	430,0 ml	RPMI 1640
	50,0 ml	FBS
	10,0 ml	Hepes Puffer (1 M)
	5,0 ml	Glutamin
	5,0 ml	Penicillin/Streptomycin (5.000 U/ml)

Steril filtriert im Sterilcup/Steriltop.

2.5 Zellkulturen

2.5.1 HUVEC = *Human Umbilical Vein Endothelial Cells*

Humane Endothelzellen wurden aus Umbilikalvenen von Nabelschnüren präpariert und kultiviert. Die Nabelschnüre wurden freundlicherweise vom Zentrum der Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Universitätsklinik Frankfurt am Main zur Verfügung gestellt.

2.5.2 PTC = proximale Tubulusepithelzellen

Humane proximale Tubulusepithelzellen aus definierten Segmenten des humanen Tubulussystems (proximal) wurden mittels immunomagnetischer Separationsmethode isoliert. Zur Verfügung gestellt durch das nephrologische Forschungslabor der Universitätsklinik Frankfurt am Main.

2.5.3 Caki-1

Humanes klarzelliges Nierenzellkarzinom. Einschichtig wachsende Zelllinie aus dem Patientenisolat der Niere eines 49-jährigen Mannes. Von Hippel-Lindau positiv (VHL +/+). Erhalten vom Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ, Heidelberg).

2.5.4 Caki-2

Humanes Nierenzellkarzinom. Einschichtig wachsende Zelllinie aus dem Patientenisolat eines 69-jährigen Mannes. Von Hippel-Lindau negativ (VHL -/-). Aus der Deutschen Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ, Braunschweig).

2.5.5 A498

Humanes Nierenzellkarzinom. Einschichtig wachsende Zelllinie aus dem Patientenisolat der Niere eines 52-jährigen Mannes. Von Hippel-Lindau negativ (VHL -/-). Aus dem Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ, Heidelberg).

2.5.6 KTCTL-26

Humanes klarzelliges Nierenzellkarzinom. Einschichtig wachsende Zelllinie aus dem Patientenisolat der Niere eines 77-jährigen Mannes. Von Hippel-Lindau negativ (VHL -/-). Erhalten von dem Deutschen Krebsforschungszentrum (DKFZ, Heidelberg).

2.6 Tiermodell

Immundefiziente Nacktmäuse NMRI, nu/nu Mäuse. Gezüchtet in der *Experimental Pharmacology & Oncology* GmbH (EPO, Berlin). Verwendet für xenogene Transplantation mit Caki-1 Zellen.

3 Methoden

3.1 Zellkulturarbeiten

3.1.1 Umsetzen (= *Splitten*) konfluenter Zellen

Das Nährmedium wurde aus der Kulturflasche entfernt und die Zellen (HUVEC und NZK-Zellen) einmal mit 10 ml PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) gewaschen. Auf die Zellen wurden 1-3 ml (je nach Größe der Kulturflasche) Accutase pipettiert und diese 3 min bei 37° C inkubiert. Die abgelösten Zellen wurden in Nährmedium aufgenommen, gut homogenisiert und mit einer Ratio von 1:2 bis 1:10 auf neue Kulturflaschen verteilt. Die Kulturflaschen wurden bei 37° C, 5 % CO_2 und 90 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert. HUVEC wurden dabei nicht öfter als 5 x, NZK-Zellen nicht öfter als 20 x passagiert.

3.1.2 Einfrieren von Zellen

Das Einfriermedium (siehe unten) wurde auf Eis hergestellt und die benötigte Anzahl an Kryoröhrchen beschriftet. Die Zellen wurden wie beim Umsetzen (siehe 3.1.1) abgelöst. Das Nährmedium wurde dabei nicht verworfen, sondern für den Abspülvorgang beim Lösen der Zellen verwahrt. Die gelösten Zellen wurden in Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei 1.050 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet in das Einfriermedium aufgenommen, resuspendiert und je 1 ml in die vorbereiteten Kryoröhrchen (auf Eis) aliquotiert. Die Kryoröhrchen wurden zum Einfrieren bei -80° C in eine Kryobox überführt, dadurch erfolgte ein schonendes Einfrieren in 1° C Schritten. Für die längere Lagerung wurden die Aliquots in Flüssigstickstoff (-196° C) gegeben. Eine konfluent gewachsene 75 cm²-Kulturflasche diente der Herstellung von vier Aliquots.

<u>Einfriermedium:</u>	70 %	Medium (ohne Zusätze)
	20 %	FBS
	10 %	DMSO

3.1.3 Auftauen von Zellen

Die 1 ml Aliquots (Kryoröhrchen) mit den eingefrorenen Zellen aus dem Flüssigstickstoff (-196° C) wurden schonend im Wasserbad angetaut. Wenn nur noch ein kleiner Eisklumpen vorhanden war, wurde der Inhalt in ein 15 ml Zentrifugenröhrchen mit 10 ml Nährmedium überführt und 5 min bei 1.050 rpm und 4° C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet (Zellen) in Nährmedium

aufgenommen, homogenisiert und in 25 cm²-Kulturflaschen ausgesät. Die Kulturflaschen wurden bei 37° C, 5 % CO₂ und 90 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert.

3.1.4 Behandlung mit VPA und IFN-alpha

Zur Evaluierung des Einflusses von VPA und IFN-alpha auf die Tumorprogression wurden die NZK-Zellen, wenn nicht anders angegeben, für 3 und 5 Tage wie folgt behandelt:

- A) unbehandeltes Nährmedium (Kontrolle)
- B) + IFN-alpha (200 U/ml)
- C) + VPA (0,25 mM)
- D) + VPA (0,25 mM) + IFN-alpha (200 U/ml)
- E) + VPA (1 mM)
- F) + VPA (1 mM) + IFN-alpha (200 U/ml)

3.2 Analyse des Tumorwachstums in vitro

Das entartete Wachstum ist ein entscheidendes Kennzeichen für die Malignität von Tumoren. Das veränderte Proliferationsverhalten beruht dabei u. a. auf Störungen der Zellzyklusregulation. In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss von VPA und IFN-alpha auf die Proliferation, die Zellzyklusphasen und auf die Expression von Zellzyklusproteinen näher evaluiert. Um eine mögliche Beteiligung apoptotischer Effekte an der anti-proliferativen Wirkung von VPA und IFN-alpha zu determinieren, wurden auch diese gemessen.

3.2.1 Proliferation der NZK-Zellen - MTT-Test

Mittels MTT-Test (3-[4,5-dimethylthiazol-2-yl]-2,5-diphenyl tetrazolium bromid, *Cell Proliferation Kit I*) sollten Unterschiede im Proliferationsverhalten der NZK-Zellen nach VPA- und/oder IFN-alpha-Behandlung im Vergleich zu den Kontrollen aufgezeigt werden. Hierzu wurden die Tumorzellen nach obigem Schema (siehe 3.1.4) in 25 cm²-Kulturflaschen kultiviert und behandelt. Die Kontrollzellen blieben unbehandelt. Nach 3 und 5 Tagen wurden die Zellen abgelöst (siehe 3.1.1), 5 min bei 1.050 rpm zentrifugiert und in 1 ml Kulturmedium aufgenommen. Zur Zellzahlbestimmung und Überprüfung der Zellvitalität wurden 10 µl der Zellsuspension zu 90 µl 0,4 %iger Trypanblau-Lösung in ein Reaktionsröhrchen pipettiert und 2 min bei Raumtemperatur (RT) inkubiert. Während der Inkubation konnte Trypanblau in

defekte Zellen eindringen und diese anfärben. Die vitalen Zellen hingegen blieben farblos. Nach gründlicher Homogenisation des Zell-Trypanblau-Gemisches (1:10) wurden aus diesem 10 µl auf einer Neubauer-Zählkammer aufgetragen und mittels Mikroskop 4 x 16 Quadrate der Zählkammer ausgezählt. Neben den vitalen Zellen wurden dabei ferner die nicht vitalen (= blauen) Zellen notiert, um die allgemeine Vitalität der Zellen bestimmen zu können.

Aus den gezählten vitalen Zellen wurde die Gesamtzellzahl pro ml errechnet.

$$G = n \times 10^4 \times F$$

G = Gesamtzellzahl/ml

n = durchschnittliche Zellzahl der 4 großen Quadrate der Neubauer-Zählkammer

F = Verdünnungsfaktor (in Trypanblau) = 10

Für die Eichkurvenbestimmung wurde die Zellzahl der Kontrollzellen im Nährmedium auf 5×10^5 Zellen/ml eingestellt. Aus dieser Zellsuspension wurden die gewünschten Konzentrationen der Eichkurve (5×10^4 , 3×10^4 , 2×10^4 , 1×10^4 , 5.000 und 2.500 Zellen/Loch) hergestellt und 100 µl davon in 96-Loch-Platten pipettiert (doppelter Ansatz). Ferner dienten 2 Löcher mit Nährmedium als Nullkontrolle. Die 96-Loch-Platten wurden direkt mit 10 µl MTT *labeling reagent*/Loch versehen.

Die Zellzahl der zu untersuchenden Proben wurde hingegen auf 1×10^5 Zellen/ml eingestellt. Jeweils 50 µl dieser Zellsuspensionen wurden als doppelter Ansatz in 96-Loch-Platten pipettiert (5.000 Zellen/Loch). Zu diesen 50 µl Zellsuspension wurden weitere 50 µl des Mediums bzw. Medium mit doppelt konzentriertem VPA und/oder IFN-alpha pipettiert. Die so bestückten 96-Loch-Platten wurden für 24, 48 und 72 Stunden bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Nach der jeweiligen Inkubationszeit wurden 10 µl MTT *labeling reagent*/Loch hinzugefügt.

Die weiteren Schritte verliefen für Eichkurve und Proben gleich. Die 96-Loch-Platten inkubierten nach Zugabe der MTT *labeling reagent* 4 Stunden bei 37° C im Brutschrank. Dann wurden pro Loch 100 µl Solubilisierungspuffer (1 x, gebrauchsfertig) hinzu pipettiert und erneut für 12 Stunden bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Die darauf folgende Messung erfolgte bei einer Wellenlänge von 630 nm am *Enzyme-linked Immunosorbent Assay* (ELISA)-Gerät. Die Messungen der Proben wurden

jeweils mit der Messungen der Eichkurve verrechnet, wodurch sich die absoluten Zellzahlen der einzelnen Proben ermitteln ließen. Anhand dieser konnten Proliferationsunterschiede bestimmt werden.

3.2.2 Analyse des Zellzyklus

Zur Analyse des Zellzyklus wurden synchronisierte Tumorzellen verwendet. Für die Synchronisation wurden die Tumorzellen für 24 Stunden mit Aphidicolin (1 µg/ml) behandelt. Aphidicolin induziert einen Zellzyklusarrest beim Übergang von der G1- in die S-Phase (Shen et al. 2001, Igawa et al. 1994). Eine Kontrolle verblieb ohne Aphidicolinzugabe. Danach wurde 2 x mit Nährmedium gewaschen und die Tumorzellen nach weiterer 4-stündiger Inkubation in Medium mit VPA und IFN-alpha verarbeitet. Die zuverige Applikation von Aphidicolin bewirkte dabei einen synchronen Eintritt in die S-Phase.

Die Analyse des Zellzyklus erfolgte mittels *CycleTEST™ PLUS DNA Reagent Kit*. Die Zellen wurden mittels Accutase abgelöst und 5 min bei 1.050 rpm zentrifugiert. Das Zellpellet wurde 2 x mit PBS gewaschen und in 1 ml Pufferlösung auf Eis aufgenommen. Die Zellzahl wurde mittels Neubauer-Zählkammer bestimmt, parallel wurde durch Trypanblau die Vitalität der Zellen überprüft (siehe 3.2.1). Die Zellzahl wurde in 1,5 ml Reaktionsröhrchen in Pufferlösung auf 500.000 Zellen/ml eingestellt und 5 min bei 1.050 rpm und 4° C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet möglichst gut getrocknet. Dieses wurde dann in 250 µl Lösung A (Trypsinpuffer) vorsichtig resuspendiert und 10 min bei RT inkubiert. Zu diesem Gemisch wurden 200 µl Lösung B (Trypsininhibitor & RNase-Puffer) gegeben, erneut vorsichtig resuspendiert und 10 min bei RT inkubiert. Daraufhin erfolgte auf Eis im Dunkeln die Zugabe von 200 µl Lösung C (Propidiumiodid Färbelösung), vorsichtige Resuspension und 10 min Inkubation. Die Zellsuspension wurde daraufhin in 5 ml FACS-Röhrchen filtriert und am Durchflusszytometer gemessen. Die Proben waren 3 Stunden stabil. Für die Einstellung der Zellzyklusphasen am Durchflusszytometer dienten Leukozyten.

3.2.3 Intrazelluläre Expression von Zellzyklusproteinen – Western Blot Analyse

3.2.3.1 Proteinextraktion aus NZK-Zellen

Für die Proteinextraktion wurden 75 cm²-Kulturflaschen mit konfluent gewachsenen Tumorzellen verwendet. Die Zellen wurden mit PBS (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺)

gewaschen und in 10 ml kaltem PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) mittels Zell-*Scraper* abgelöst. Dieses PBS-Zellgemisch wurden in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und für 5 min bei 4° C bei 1.040 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen. Auf das Zellpellet wurden 500 µl Lysispuffer (1,5 ml + 7,5 µl PMSF, siehe unten) pipettiert und auf Eis 5-10 min inkubiert. Das Zelllysat wurde ebenfalls in auf Eis stehende 1,5 ml Reaktionsröhrchen überführt, mit einer 1 ml Insulinspritze 10 x resuspendiert und bei 4° C 10 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Die Proteine befanden sich im Überstand. Dieser wurde auf Eis in Kryoröhrchen pipettiert und entweder sofort weiter verarbeitet oder bei -80° C gelagert.

Lysispuffer (100 ml)

zu 75 ml destilliertem Wasser wurden hinzugefügt:

790	mg	Tris
900	mg	NaCl
10	ml	10 %ige Tergitollösung
2,5	ml	10 %ige Na-deoxycholatelösung
1	ml	EDTA [0,1 M]

mit destilliertem Wasser auf 92,2 ml aufgefüllt und

100	µl	Aprotinin [1 mg/ml] (in H_2O gelöst)
100	µl	Leupeptin [1 mg/ml] (in H_2O gelöst)
100	µl	Pepstatin [1 mg/ml] (in Methanol gelöst)
500	µl	NaF [0,2 M] (in H_2O gelöst)
500	µl	Na_3VO_4 [0,2 M] (in H_2O gelöst)
500	µl	PMSF [0,2 M] (in Isopropanol gelöst)

dazu gegeben.

3.2.3.2 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte mittels des DC Protein Assays, welches auf der Grundlage der Proteinbestimmung von Lowry aufgebaut ist. Jeweils 10 µl der Zelllysate wurden in einem 1,5 ml Reaktionsröhrchen mit 90 µl destilliertem Wasser versetzt. Ferner wurden 500 µl Reagenz A (= alkalische Kupfer-Tartrat-Lösung) und 4 ml Reagenz B (= Folin Reagenz) beigefügt. Die Proben wurden gut durchmischt und 15-30 min bei RT inkubiert. Danach wurden die optischen Dichten der Extinktionen am ELISA-Gerät bei 750 nm in einer Doppelmessung direkt gegen die Referenz gemessen. Als Referenz zur Einstellung des Nullwertes wurde destilliertes Wasser verwendet. Mittels einer Eichkurve aus Proben unterschiedlicher

Konzentration Albumins aus Rinderserum (BSA) wurde per Computer die jeweilige Proteinkonzentration errechnet.

3.2.3.3 Proteinauftrennung

Die Proteinauftrennung erfolgte mittels SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese in der „BIORAD Mini Protein II“-Apparatur. Für die Auftrennung der Proteine wurden je nach Molekulargewicht Glycingele mit 4 %igem Sammelgel und 7-15 %igem Trenngel (nach Laemmli) gegossen. Die Sammel- und Trenngel waren wie folgt zusammengesetzt (Tab. 2 & 3):

Trenngel

Lösungen	7 %	8 %	10 %	12 %	15 %
Aqua dest.	3,9 ml	3,5 ml	2,6 ml	1,75 ml	150 µl
10 % SDS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
Trenngelpuffer	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml	2,5 ml
Acrylamid A	2,3 ml	2,6 ml	3,2 ml	3,9 ml	4,85 ml
Bisacryl B	1,1 ml	1,2 ml	1,6 ml	1,8 ml	2,25 ml
10 % APDS	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl	100 µl
TEMED	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl	10 µl
kDa	30-100	20-80	15-60	10-50	5-30

Tabelle 2: Western Blot: Zusammensetzung der Trenngel.

Sammelgel

Lösungen	4 %
Aqua dest.	5,4 ml
10 % SDS	100 µl
Sammelgelpuffer	2,5 ml
Acrylamid A	1,3 ml
Bisacryl B	0,6 ml
10 % APDS	100 µl
TEMED	20 µl

Tabelle 3: Western Blot: Zusammensetzung des 4 %igen Sammelgels.

Die vorbereiteten Gelkammern wurden zunächst mit 7 ml Trenngel gefüllt. Zum Versiegeln und für eine bessere Polymerisation wurden 100-200 µl Isobutanol auf

das Trenngel pipettiert. Nach 15-20 min war das Trenngel polymerisiert, das Isobutanol wurde mit destilliertem Wasser aus der Gelkammer gespült und diese mit Filterpapier getrocknet. Auf das Trenngel wurde dann das Sammelgel gegossen, dem im noch flüssigen Zustand die Gelkämme für die Formung der Auftragesaschen aufgesetzt wurden. Nach der Polymerisation des Sammelgels wurden die Kämme herausgenommen und die Taschen mit destilliertem Wasser gewaschen. Danach wurde die Elektrophoreseapparatur aufgebaut und mit 1 x Elphopuffer (Tab. 4) aufgefüllt. Als Größenstandard wurde der peqGOLD Protein-Marker IV verwendet. Je Probe wurden 50 µg Protein in die Taschen aufgetragen. Die Proteinproben wurden dabei zuvor 1:1 mit Laemmli-Probenpuffer versetzt und 5 min bei 95° C im Thermo-block denaturiert. Die Elektrophorese wurde bei einer Spannung von 80 V (PowerPac 300 Power Supply) begonnen und nachdem die Proben das Sammelgel durchlaufen hatten auf 120 V erhöht. Die Proteine wurden im Trenngel entsprechend ihrer Größe aufgetrennt. Das Gel wurde nach der Auftrennung für die Western-Hybridisierung verwendet.

3.2.3.4 Western-Hybridisierung

Bei der Western-Hybridisierung wurden die aufgetrennten Proteine der SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese auf eine Nitrozellulosemembran übertragen. Für diesen Vorgang wurden sowohl die Nitrozellulosemembran, wie auch das *Blotting*-Papier und die Schwammtücher für 10-15 min in 1 x Transferpuffer (Tab. 4) eingeweicht. Auf ein Schwammtuch und vier Lagen *Blotting*-Papier wurde das Gel mit den aufgetrennten Proteinen gegeben. Darauf wurde die Nitrozellulosemembran gelegt und festgedrückt. Auf die Membran folgten erneut vier Lagen *Blotting*-Papier und ein Schwammtuch. Das eingebettete Proteingel wurde in die Transfer-einrichtung der Proteintransfer-Apparatur eingespannt. Diese wurde mit einem Kühlakku versehen und mit 1 x Transferpuffer aufgefüllt. Die Western-Hybridisierung erfolgte eine Stunde bei einer Spannung von 100 V (PowerPac 300 Power Supply). Danach befanden sich die aufgetrennten Proteine auf der Nitrozellulosemembran und konnten durch Immunfärbung mit spezifischen Antikörpern detektiert und durch Chemolumineszenzen sichtbar gemacht werden.

3.2.3.5 Immunfärbung und Chemolumineszenz

Die Nitrozellulosemembran wurde einmal mit 1 x Towbinpuffer (Tab. 4) gewaschen. Um ein unspezifisches Binden der Antikörper zu vermeiden, wurde die Membran für eine Stunde in Blockierlösung (Tab. 4) auf den Schwenktisch gestellt. Die Blockierlösung wurde dann abgegossen und der jeweilige Primärantikörper (Tab. 5) auf die

Membran gegeben. Dieser wurde über Nacht im Kühlschrank oder für eine Stunde bei RT auf der Membran belassen. Die Membran wurde dreimal 15 min mit Blotpuffer (Tab. 4) gewaschen und eine halbe Stunde mit dem Sekundäntikörper (Tab. 5) inkubiert. Erneut wurde die Membran dreimal für 15 min mit Blotpuffer und einmal für 5 min mit destilliertem Wasser gewaschen. Eine Chemolumineszenzlösung (ECL-Lösung) aus gleichen Teilen *Detection Reagent 1* und 2 wurde angesetzt, jeweils 1 ml davon gleichmäßig auf der Nitrozellulosemembran verteilt und 1 min inkubiert. Mit Hilfe einer Pinzette wurde die Membran abgetropft und in eine vorbereitete Plastikhülle in der *Doppelscreen-* bzw. Fotokassette gelegt. In der Dunkelkammer wurde ein Röntgenfilm auf die Plastikhülle mit der Membran gelegt und nach einer gewissen Inkubationszeit (1-45 min) in den Entwickler gegeben. Durch die Chemolumineszenz wurden die Proteinbanden mit gebundenen Antikörpern auf dem Röntgenfilm abgelichtet und nach der Entwicklung sichtbar. Nach dem Eintragen der Banden des Protein-Markers IV konnte die jeweilige Auswertung durch Vergleich der Bandenintensitäten erfolgen. Als Kontrollen für eine gleichmäßige Proteinbeladung diente β -Aktin.

Antikörperpuffer			
90 ml	Blotpuffer		
10 ml	5 g BSA in 100 ml Blot-Puffer		
Blotpuffer		Blockierlösung	
100 ml	10x Towbinpuffer	100 ml	1 x Towbinpuffer
5 ml	Tween 20	10 g	Magermilchpulver
895 ml	destilliertes Wasser		
10 x Elphopuffer (pH 8,3)		1 x Elphopuffer (Laufpuffer)	
30,3 g	Tris	100 ml	10 x Elphopuffer
144,0 g	Glycin	900 ml	destilliertes Wasser
10,0 g	SDS		
1 l	destilliertes Wasser		
10 x Transferpuffer		1 x Transferpuffer	
30,3 g	Tris	100 ml	10 x Transfer-Puffer
144,0 g	Glycin	200 ml	Methanol
1 l	destilliertes Wasser	700 ml	destilliertes Wasser
10 x Towbinpuffer		1 x Towbinpuffer	
12,1 g	Tris	100 ml	10 x Towbinpuffer
90,0 g	NaCl	900 ml	destilliertes Wasser
1 l	destilliertes Wasser		

Tabelle 4: Western Blot: Pufferlösungen für die Zellyse, SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese, Western-Hybridisierung, Immunfärbung und *Stripping*.

Primärantikörper	Klon	kDa	Herkunft	Verd.
β-Aktin (Maus IgG1)	AC-15	42	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)	1:1.000
Cdk1/Cdc2 (Maus IgG1)	1/Cdk1/ Cdc2	34	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:2.500
Cdk2 (Maus IgG2a)	55/Cdk2	33	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:2.500
Cdk4 (Maus IgG1)	97	33	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:250
Cyclin A (Maus IgG1)	25/ Cyclin A	60	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:250
Cyclin B (Maus IgG1)	18/ Cyclin B	62	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:1.000
Cyclin D3 (Maus IgG2b)	1	33	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:1.000
Rb (Maus IgG2a)	2	110	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:250
Rb2 (Maus IgG2a)	10/Rb2	130	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:1.000
p19 (Maus IgG1)	52/p19	19	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:5.000
p21 (Maus IgG1, K)	2G12	21	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:250
Kip1/p27 (Maus IgG1)	57	27	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:500
PCNA (Maus IgG1)	24	36	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:5.000
Sekundärantikörper			Herkunft	Verd.
Ziege-Anti-Maus HRP			Upstate Bio- technology (USA)	1:5.000

Tabelle 5: Western Blot: Zellzyklusproteine. Primär- und Sekundärantikörper mit Klon-, Herkunfts- und Verdünnungsangaben. Die Verdünnungen erfolgten im Antikörperpuffer.

3.2.3.6 Stripping

Die Nitrozellulosemembranen wurden in der Regel mindestens zweimal verwendet. Jeweils einmal für die Detektion gewünschter Proteine und ein zweites Mal für den β-Aktin Nachweis, um die Übereinstimmung der eingesetzten Proteinmengen überprüfen zu können. Zu diesem Zweck mussten die Membranen von den gebundenen Antikörpern befreit werden. Die Membran wurde dazu dreimal für 10 min mit 1 x

Towbinpuffer (Tab. 4) gewaschen und für eine halbe Stunde auf 10 ml 1 x *Antibody Stripping Solution* (1 ml 10 x *Stripping Solution* + 9 ml destilliertem Wasser) inkubiert. Die Membran wurde erneut dreimal für 10 min mit 1 x Towbinpuffer gewaschen. Danach wurde die Membran erneut blockiert und weiterhin verfahren wie in Punkt 3.2.3.5.

3.2.4 Apoptose

Apoptose, der programmierte Zelltod, kann bei Tumorzellen induziert werden und stellt damit eine Angriffsoption anti-tumoraler Substanzen bei der Tumorbekämpfung dar. Zur Evaluierung einer möglichen Beteiligung der Apoptose an den anti-proliferativen Effekten von VPA und IFN-alpha wurden entsprechende Messungen durchgeführt.

3.2.4.1 Annexin V-FITC Apoptosis Detection Kit I

Anhand dieses *Kits* konnte die Apoptose detektiert werden. Annexin V ist ein 35-36 kDa Ca^{2+} -abhängiges Phospholipid-Bindeprotein, mit einer hohen Affinität für Phospholipid-Phosphatidylserine (PS) der Membran. Während der frühen Phase der Apoptose werden die PS externalisiert. Durch die Bindung von Annexin V-FITC konnten die PS sichtbar gemacht werden. Durch Zugabe von Propidiumiodid (PI) wurden zusätzlich die bereits toten Zellen identifiziert. Sie sind Annexin V-FITC und PI positiv, da die Membran der toten Zellen PI eindringen lässt.

Zur Durchführung dieses Experiments wurden die Tumorzellen aus der 25 cm²-Kulturflasche mit Accutase abgelöst, in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und bei 4° C und 1.050 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet auf Eis zweimal mit PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) gewaschen und in 1 ml 1 x Bindepuffer (1:10 Verdünnung: 10 x Bindepuffer + destilliertes Wasser) aufgenommen. Mittels der Neubauer-Zählkammern wurde die Zellzahl bestimmt und in Bindepuffer auf 2×10^6 Zellen/ml eingestellt. 100 µl dieser Zellsuspensionen (2×10^5 Zellen) wurden auf Eis in FACS-Röhrchen überführt. Je Ansatz wurden die Zellen wie folgt behandelt:

	Annexin V-FITC	Propidiumiodid
K1	/	/
K2	5 µl	/
K3	/	5 µl
P	5 µl	5 µl

Tabelle 6: Annexin V-FITC Apoptose Detektions Kit I: Behandlung jedes Ansatzes: K1 = Kontrolle ohne Zugaben, K2 = Kontrolle frühe Apoptose, K3 = Kontrolle tote Zellen, P = Messprobe.

Die Zugabe von Annexin V-FITC und Propidiumiodid erfolgte im Dunkeln. Die FACS-Röhrchen wurden vorsichtig gevortext und 15 min bei RT inkubiert. Danach wurden 400 µl 1 x Bindepuffer hinzu pipettiert. Die Fluoreszenz war für eine Stunde stabil. Die Messung erfolgte am Durchflusszytometer.

3.2.4.2 Quantikine Human active Caspase-3 Immunoassay

Mittels dieses Immunassays konnte quantitativ die Konzentration humaner aktiver Caspase-3 (ng/ml) im Zellextrakt ermittelt werden.

Die Durchführung erfolgte nach dem Herstellerprotokoll. Die NZK-Zellen wurden für diesen Versuch in 25 cm²-Kulturflaschen kultiviert. Im ersten Schritt inkubierten die NZK-Zellen 2 Stunden auf 300 µl 1 x Extraktionspuffer bei RT. Der 1 x Extraktionspuffer wurde jeweils frisch hergestellt. Der Ansatz erfolgte jeweils 2-fach. Nach dem Überführen in 96-Loch-Platten und Biotinmarkierung (siehe Herstellerprotokoll), war die Markierung für 3 ½ Stunden stabil. Die 96-Loch-Platte wurde bei einer Wellenlänge von 450 nm am ELISA-Gerät gemessen.

3.3 Untersuchung von Adhäsions- und Migrationsphänomenen

Die Analyse des Migrationsverhaltens nahm einen dominanten Raum ein, da die Problematik beim fortgeschrittenen NZK invasiv gewachsene Tumore betrifft. Mittels Adhäsionsstudien an Endothel oder extrazelluläre Matrixproteine wurden Unterschiede im invasiven Verhalten der Tumorzellen nach VPA- und IFN-alpha-Behandlung gegenüber den Kontrollen evaluiert. Des Weiteren wurde die Expression relevanter Adhäsionsproteine (Integrine und CD44-*Splicevarianten*) ermittelt. Da die Polymerisation des F-Aktins u. a. invers mit der Zellmotilität korreliert, wurde eine entsprechende Messung des F-Aktin-Gehalts vorgenommen.

3.3.1 Adhäsion an Endothelzellen (HUVEC)

Präparation der Endothelzellen (HUVEC) aus Umbilikalvenen

Die Präparation der HUVEC aus der Nabelschnur erfolgte über einer sterilen Petrischale. Die ggf. noch vorhandenen Nabelschnurklemmen wurden mit einer Schere abgeschnitten, eine Knopfkanüle in die Umbilikalvene eingeführt und mittels einer chirurgischen Klemme (= Klemmschere) fixiert. Auf die Knopfkanüle wurde eine mit PBS (ohne Ca^{2+} und Mg^{2+}) gefüllte 50 ml Perfusionspritze aufgeschraubt. Die Durchspülung der Vene mit dem enthaltenden PBS diente dem Entfernen des Blutkoagels. Danach wurde eine Spritze (10 ml) mit 6 ml eines Dispase/PBS-Gemisches (1:10) gefüllt und diese anstelle der Perfusionspritze an die Knopfkanüle angebracht. Mit einem Teil des Gemisches wurde das restliche PBS aus der Vene gespült. Die Nabelschnur wurde dann am unteren Ende mit einer weiteren Klemmschere abgeklemmt, mit dem Dispase/PBS-Gemisch gefüllt und 10 min inkubiert. Die Dispase löst dabei die Endothelzellen aus ihrem natürlichen Zellverband. Eine Perfusionspritze mit Grundmedium wurde nach der Inkubation auf die Knopfkanüle aufgeschraubt, die untere Klemmschere gelöst und das Grundmedium stoßweise durch die Vene gepumpt. Das mit Endothelzellen angereicherte Grundmedium wurde in 50 ml Zentrifugenröhrchen aufgefangen und 5 min bei 1.050 rpm und RT zentrifugiert. Der Überstand des Zentrifugats wurde verworfen, das Pellet in 5 ml Nährmedium resuspendiert und in 25 cm^2 -Kulturflaschen überführt. Die Kulturflaschen wurden bei 37° C, 5 % CO_2 und 90 % Luftfeuchtigkeit im Brutschrank inkubiert.

Adhäsion der NZK-Zellen an Endothel

Am Vortag der Adhäsionsstudie wurden HUVEC auf 6-Loch-Platten so ausgesät, dass sie am Versuchstag subkonfluent waren. Die mit VPA und/oder IFN vorbehandelten Tumorzellen und deren unbehandelte Kontrollen wurden am Versuchstag abgelöst, zentrifugiert, in 1 ml Nährmedium aufgenommen und die Zellzahl bestimmt (siehe 3.2.1). Die Zellzahl wurde durch Zugabe entsprechender Mengen Nährmedium auf 5×10^5 Zellen/ml eingestellt. Jeweils 1 ml bzw. 5×10^5 Tumorzellen wurden auf eine Vertiefung der 6-Loch-Platten mit ausplattierten HUVEC gegeben. Die 6-Loch-Platten wurden dann 1, 2 oder 4 Stunden bei 37° C im Brutschrank inkubiert. Die Kulturplatten wurden dreimal mit PBS (mit Ca^{2+} und Mg^{2+}) gewaschen und 10 min mit bei 4° C gekühltem 1 %igem Glutaraldehyd fixiert. Die Zellen wurden noch einmal mit PBS (mit Ca^{2+} und Mg^{2+}) gewaschen. Erneut wurde PBS (mit Ca^{2+} und Mg^{2+}) auf die Zellen gegeben. Die 6-Loch-Platten konnten so mehrere Wochen bei 4° C aufbewahrt werden. Unter dem Mikroskop konnten die

am Endothel adhären Tumorzellen ausgezählt werden (200-fache Vergrößerung). Es wurden drei bis fünf Sichtfelder (je 0,25 mm²) gezählt und der sich daraus ergebende Mittelwert bestimmt.

3.3.2 Adhäsion an immobilisierte extrazelluläre Matrixproteine (EZM-Proteine)

Für die Adhäsionsstudie wurden 24-Loch-Platten mit Kollagen-G (400 µg/ml), Fibronectin (100 µg/ml) oder Laminin (50 µg/ml) behandelt. Die Einstellung der Matrixprotein-Konzentrationen erfolgte mittels PBS (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺). Als Kontrolle wurden vorbeschichtete Poly-D-Lysin-Platten und unbeschichtete 24-Loch-Platten verwendet. Die vorbehandelten Kulturplatten wurden über Nacht bei 4° C inkubiert. Am nächsten Tag wurden die 24-Loch-Platten dreimal mit PBS (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) gewaschen und anschließend bei RT eine Stunde mit 1 ml Blockierpuffer (1 % BSA in PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) blockiert. Währenddessen wurden die Tumorzellen abgelöst, zentrifugiert, in 1 ml Bindepuffer (450 µl 1 M CaCl₂ + 250 µl 1 M MgCl₂ in 500 ml PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) aufgenommen und die Zellzahl/ml ermittelt (siehe 3.2.1). Die Zellzahl/ml wurde durch Zugabe entsprechender Mengen Bindepuffer auf 2 x 10⁵ Zellen/ml eingestellt. Die blockierten Kulturplatten wurden erneut dreimal mit PBS (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) gewaschen. 500 µl eingestellter Zellsuspension, 1 x 10⁵ Zellen, wurden jeweils in eine Vertiefung der vorbehandelten Platten pipettiert und 30-60 min bei 37° C inkubiert. Dreimal wurden die Kulturplatten mit Bindepuffer gewaschen und 10 min mit bei 4° C gekühltem 2 %igem Glutaraldehyd bei RT fixiert. Die Kulturplatten wurden erneut mit PBS (mit Ca²⁺ und Mg²⁺) gewaschen und 500 µl PBS (mit Ca²⁺ und Mg²⁺) auf jede Vertiefung gegeben. Die Kulturplatten waren so bei 4° C einige Wochen haltbar. Die Auszählung der adhären Tumorzellen erfolgte unter dem Mikroskop (200-fache Vergrößerung). Es wurden drei bis fünf Sichtfelder (je 0,25 mm²) gezählt und der sich daraus ergebende Mittelwert bestimmt.

3.3.3 Intrazelluläre Expression relevanter Adhäsionsproteine - Western Blot Analyse

Zur Evaluierung der der Adhäsions-Inhibition zugrunde liegenden Mechanismen wurde mittels Western Blot Analyse (siehe 3.2.3) die intrazelluläre Expression von Integrinen und Proteinen des Integrin-Signalwegs (Integrin-*linked* Kinase (ILK) und die fokale Adhäsions-Kinase (FAK)) untersucht. Integrine gelten als Schlüsselproteine der Adhäsion, Migration, Metastasierung, Differenzierung und Proliferation.

Primärantikörper	Klon	kDa	Herkunft	Verd.
β-Aktin (Maus IgG1)	AC-15	42	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)	1:1.000
ILK (Maus IgG1)	3	50	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:1.000
FAK (Maus IgG1)	77	125	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:1.000
Phospho-FAK (Maus IgG1)	18	125	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:1.000
Integrin β1 (Maus IgG1)	18	130	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:2.500
Integrin β3 (Maus IgG1)	1	104	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:2.500
Integrin β4 (Maus IgG1)	7	200	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:250
Integrin alpha1 (VLA-1, Kaninchen)		200	Chemicon/Millipore GmbH (Schwalbach)	1:1.000
Integrin alpha2 (VLA-2, Maus IgG2a)	2	150	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:250
Integrin alpha3 (VLA- 3alpha, Kaninchen)		150	Chemicon/Millipore GmbH (Schwalbach)	1:1.000
Integrin alpha4 (Ziege)	C-20	150	Santa Cruz Biotechnology (USA)	1:200
Integrin alpha5 (Maus IgG2a)	1	150	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:5.000
Integrin alpha6 (Kaninchen)	H-87	150	Santa Cruz Biotechnology (USA)	1:200
Sekundärantikörper			Herkunft	Verd.
Ziege-Anti-Maus HRP			Upstate Biotechnology (USA)	1:5.000
Ziege-Anti-Kaninchen HRP			Upstate Biotechnology (USA)	1:5.000
Rind-Anti-Ziege HRP			Santa Cruz Biotechnology (USA)	1:5.000

Tabelle 7: Western Blot: Integrinsubtypen und Proteine des Integrin-Signalwegs. Primär- und Sekundärantikörper mit Klon-, Herkunfts- und Verdünnungsangaben. Die Verdünnungen erfolgten im Antikörperpuffer.

3.3.4 Oberflächenexpression der Integrinsubtypen und CD44-Splicevarianten - Durchflusszytometrie/FACScan-Analyse

Mittels Durchflusszytometrie wurde die Oberflächenexpression definierter Integrinsubtypen und CD44-Splicevarianten detektiert. Wie die Integrine sind CD44-Proteine in die Adhäsion, Migration, Proliferation sowie das Überleben von Zellen involviert.

Für die Versuche wurden NZK-Zellen verwendet, die in 75 cm²-Kulturflaschen subkonfluent gewachsen waren. Die Zellen wurden einmal mit 10 ml PBS (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) gewaschen und mittels 3 ml Accutase abgelöst. Das Accutase-Zell-Gemisch wurde in 7 ml PBS (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) aufgenommen und in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Die Zellsuspension wurde 5 min bei 1.050 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet auf Eis in 2 ml FACS-Puffer (PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ + 0,5 % BSA) aufgenommen, resuspendiert und 5 min bei 4° C und 1.050 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut verworfen, das Zellpellet in FACS-Puffer aufgenommen. Je 1 ml Zellsuspension wurde in auf Eis stehende FACS-Röhrchen verteilt und zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, der Primärantikörper (Tab. 8) zum Zellpellet pipettiert und mit diesem resuspendiert. Nach einer Stunde Inkubation auf Eis wurden die Zellen 2 x mit 1-2 ml FACS-Puffer gewaschen. Aufgrund der Kopplung der Integrin-Antikörper mit Phycoerythrin (PE) konnten diese direkt nach der Behandlung mit dem Primärantikörper in 250-500 µl FACS-Puffer (je Zellmenge) aufgenommen und am Durchflusszytometer gemessen werden. Zellen, die nicht mit bereits gekoppelten Antikörpern inkubiert worden waren, wurde danach im Dunkeln der Sekundärantikörper (Tab. 8) hinzu gegeben und 1 Stunde auf Eis inkubiert. Die Zellen wurden dann 2 x mit 1-2 ml FACS-Puffer gewaschen, in 250-500 µl FACS-Puffer aufgenommen, resuspendiert und am Durchflusszytometer gemessen. Zur Bestimmung der Hintergrundfluoreszenz wurden als Kontrollen Proben nur mit den entsprechenden Isootypen (Tab. 8) bzw. nur mit dem Sekundärantikörper inkubiert.

Primärantikörper	Klon	Herkunft	Verd.	Menge
CD49a-PE (Integrin alpha1, Maus IgG1)	SR84	Becton Dickinson (Heidelberg)	gebrauchsfertig	20 µl
CD49b-PE (Integrin alpha2, Maus IgG2a)	12F1-H6	Becton Dickinson (Heidelberg)	gebrauchsfertig	20 µl
CD49c-PE (Integrin alpha3, Maus IgG1)	C3 II.1	Becton Dickinson (Heidelberg)	gebrauchsfertig	20 µl
CD49d-PE (Integrin alpha4, Maus IgG1)	9F10	Becton Dickinson (Heidelberg)	gebrauchsfertig	20 µl
CD49f-PE (Integrin alpha6, Ratte IgG2a)	GoH3	Becton Dickinson (Heidelberg)	gebrauchsfertig	20 µl

CD29 R-PE (Integrin beta1, Maus IgG1)	MAR4	Becton Dickinson (Heidelberg)	gebrauchsfertig	20 µl
CD61 R-PE (Integrin beta3, Maus IgG1)	VI-PL2	Becton Dickinson (Heidelberg)	gebrauchsfertig	20 µl
CD104 R-PE (Integrin beta4, Ratte IgG2b)	439-9B	Becton Dickinson (Heidelberg)	gebrauchsfertig	20 µl
Anti-human CD44 std (Maus IgG1)	SFF-304	Bender MedSystems GmbH (Wien, Österreich)	gebrauchsfertig	40 µl = 5 µg
Anti-human CD44var (v3, Maus IgG1)	VFF-327v3	Bender MedSystems GmbH (Wien, Österreich)	1:20	50 µl = 5 µg
Anti-human CD44var (v4, Maus IgG1)	VFF-11	Bender MedSystems GmbH (Wien, Österreich)	1:10	50 µl = 5 µg
Anti-human CD44var (v5, Maus IgG1)	VFF-8	Bender MedSystems GmbH (Wien, Österreich)	gebrauchsfertig	50 µl = 5 µg
Anti-human CD44var (v6, Maus IgG1)	VFF-7	Bender MedSystems GmbH (Wien, Österreich)	1:20	50 µl = 5 µg
Anti-human CD44var (v7, Maus IgG1)	VFF-9	Bender MedSystems GmbH (Wien, Österreich)	1:20	50 µl = 5 µg
Anti-human CD44var (v7-v8, Maus IgG2b)	VFF-17	Bender MedSystems GmbH (Wien, Österreich)	1:20	50 µl = 5 µg
Anti-human CD44var (v10, Maus IgG1)	VFF-14	Bender MedSystems GmbH (Wien, Österreich)	1:20	50 µl = 5 µg
Sekundär- antikörper	Klon	Herkunft	Verd.	Menge
FITC Zieg-Anti-Maus (multiple Adsorption)		Becton Dickinson (Heidelberg)	1:50	50 µl
Isotypen	Klon	Herkunft	Verd.	Menge
Maus IgG1 R-PE	MOPC-21	Becton Dickinson (Heidelberg)	gebrauchsfertig	20 µl
Maus IgG2a R-PE	G155-178	Becton Dickinson (Heidelberg)	gebrauchsfertig	20 µl
Ratte IgG2b R-PE	R35-38	Becton Dickinson (Heidelberg)	gebrauchsfertig	20 µl

Tabelle 8: Durchflusszytometrie: Integrinsubtypen und CD44-*Splicevarianten*. Primär- und Sekundärantikörper sowie Isotypenantikörper mit Herkunfts-, Verdünnungs- und Mengenangabe.

3.3.5 Analyse des intrazellulären F-Aktin-Gehalts

Für die Bestimmung des intrazellulären F-Aktins fanden in 75 cm²-Kulturflaschen konfluent gewachsene, mit VPA und IFN-alpha behandelte NZK-Zellen Verwendung. Sie wurden mit Accutase und PBS (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) abgelöst und 2 x mit PBS (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) gewaschen, dann in 5 ml bei -20° C gekühltem Methanol:Aceton (1:1) resuspendiert und 10-15 min bei RT inkubiert. Die Zellen waren somit permeabilisiert. Danach wurden 10 ml PBS (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) hinzugefügt und 5 min bei 1.050 rpm zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Pellet erneut mit 20 ml PBS (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) gewaschen. Das Zellpellet wurde in FACS-Puffer (PBS ohne Ca²⁺ und Mg²⁺ + 0,5 % BSA) aufgenommen und resuspendiert. Je 1 ml Zellsuspension wurde auf ein FACS-Röhrchen verteilt und zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet in 55 µl Phalloidin-FITC (50 µg/ml) aufgenommen, resuspendiert und 1 Stunde bei RT inkubiert. Als Kontrollen dienten Proben, die nur mit dem FITC-Antikörper (multiple Adsorption) oder FACS-Puffer inkubierten. Die Zellen wurden dann 2 x mit FACS-Puffer gewaschen und je nach Dicke des Zellpellets in 250-500 µl FACS-Puffer aufgenommen, resuspendiert und am Durchflusszytometer gemessen.

Antikörper	Herkunft	Verd.	Menge
Phalloidin-FITC	Sigma-Aldrich GmbH (Steinheim)	1:10	55 µl
FITC Zieg-Anti-Maus (multiple Adsorption)	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:50	55 µl

Tabelle 9: Durchflusszytometrie: F-Aktin-Nachweis. Antikörper mit Herkunfts-, Verdünnungs- und Mengenangaben.

3.4 Evaluierung der HDAC-Aktivität

VPA gilt als potenter HDAC-Inhibitor. Um den Einfluss von VPA und der Kombination mit IFN-alpha auf die HDAC-Aktivität in NZK-Zellen zu verifizieren, wurde diese in verschiedenen Versuchsansätzen überprüft. Zur Messung der HDAC-Aktivität fand das *HDAC Colorimetric Assay/Drug Discovery Kit* Verwendung. Die Deacetylierung von HDAC1, HDAC2, SIRT1, HDAC3 und HDAC8 wurde mittels dieses Assays nachgewiesen. Des Weiteren wurde mit der Western Blot Analyse die intrazelluläre Expression der Histon Deacetylasen H3 und H4 sowie der Anteil acetylierter und nicht acetylierter Histone H3 und H4 nach Behandlung gegenüber den Kontrollen evaluiert.

3.4.1 HDAC Colorimetric Assay

3.4.1.1 Gewinnung des Kernextrakts

Modifizierte Form der Dignam-Methode. Zur Gewinnung des Kernextrakts wurden die Caki-1 in 75 cm²-Kulturflaschen kultiviert und 12 bzw. 24 Stunden mit VPA (1 und 5 mM) und/oder IFN-alpha (200 U/ml) behandelt. Die Zellen sollten für die Extraktion subkonfluent gewachsen sein. Das Medium wurde entfernt, die Zellen mit PBS (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺) gewaschen und 5 ml hypotonischer Puffer (Tab. 10) hinzugefügt. Die Zellen wurden dann mittels Zell-Scraper vom Untergrund gelöst und auf Eis in 50 ml Zentrifugenröhrchen überführt. Alle weiteren Schritte erfolgten auf Eis. In den Zentrifugenröhrchen wurden die gelösten Zellen mit Hilfe des Homogenisierers zerkleinert und 5 min bei 3.000 rpm und 4° C zentrifugiert. Der Überstand enthielt die zytoplasmatische Fraktion und konnte verworfen oder bei -80° C gelagert werden. Das Pellet wurde in 500 µl kaltem Extraktionspuffer (Tab. 10) resuspendiert und 20 min auf dem Schüttler inkubiert. Danach wurden die Proben 10 min bei 15.000 rpm und 4° C zentrifugiert. Das Pellet enthielt die nukleäre Matrix, im Überstand befand sich das gewünschte Kernextrakt. Dieses wurde in Kryoröhrchen überführt und direkt weiter verarbeitet oder bei -80° C gelagert.

Reagenz	Molekulargewicht	Endkonz.	Hypotonischer Puffer	Extraktionspuffer
1 M HEPES	238,3 g/l	20 mM	200 µl	200 µl
1 M KCL	74,55 g/l	10 mM	100 µl	100 µl
1 M MgCl ₂	95,21 g/l	1 mM	10 µl	10 µl
0,1 M DTT		2 M	2,5 µl	2,5 µl
10 % Triton X-100		0,1 %	100 µl	100 µl
100 % Glycerol		20 %	2 ml	2 ml
200 mM PMSF		2 mM	100 µl	100 µl
1,5 mg/ml Aprotinin		5 µg/ml	33 µl	33 µl
1 mg/ml Leupeptin		5 µg/ml	50 µl	50 µl
5 M NaCl	58,44 g/l	420 mM		840 µl
Aqua dest.			7,4 ml	6,5 ml

Tabelle 10: Kernextraktion: Zusammensetzung des hypotonischen und Extraktionspuffers. Angegebene Mengen des hypotonischen Puffers reichen für einen Ansatz, des Extraktionspuffers für 10 Ansätze.

3.4.1.2 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung erfolgte mittels des DC Protein Assay (siehe 3.2.3.2).

3.4.1.3 HDAC Colorimetric Assay

Die Durchführung erfolgte nach dem Herstellerprotokoll. Das Assay ermöglichte die Messung der Aktivität durch zwei Schritte auf derselben 96-Loch-Platte. Beim ersten Schritt wurde ein Substrat zu den Proben gegeben, welches durch die HDACs deacetylierte. Im zweiten Schritt wurde dies durch Zugabe eines Entwicklers sichtbar gemacht. Es erfolgte ein Farbumschlag (Gelbfärbung) in Abhängigkeit zur Menge des deacetylierten Substrates. Diese konnte bei einer Wellenlänge von 405 nm am ELISA-Gerät gemessen werden. Standardkurven wurden bei jedem Versuch erneut durchgeführt. Nach Zugabe des Substrates wurde 10-15 min inkubiert. Nach Zugabe des Entwicklers wurde zu verschiedenen Zeitpunkten im Zeitraum von 10-50 min gemessen, um den optimalen Farbumschlag ermitteln zu können. Als Positivkontrollen dienten Kernextrakte TSA-behandelter HeLa-Zellen.

3.4.2 Intrazelluläre Expression der HDACs und Histone – Western Blot Analyse

Um Unterschiede in der Expression von HDACs und Histonen bzw. der Acetylierung von Histonen zwischen behandelten und unbehandelten Tumorzellen zu detektieren, wurden Western Blot Analysen (siehe 3.2.3) durchgeführt. Dazu wurden Caki-1 Zellen 12 und 24 Stunden mit VPA 0,25 mM bzw. 1 mM und/oder IFN-alpha 200 U/ml inkubiert.

Primärantikörper	Klon	kDa	Herkunft	Verd.
β-Aktin (Maus IgG1)	AC-15	42	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)	1:1.000
Histondeacetylase 3 (Kaninchen)		48	Biomol GmbH (Hamburg)	1:2.000
Histondeacetylase 4 (Kaninchen)		140/ 110	Biomol GmbH (Hamburg)	1:500
Histon H3 (Kaninchen IgG)	Y173	17	Epitomics (USA)	1:5.000
Acetyl-Histon H3 (Kaninchen IgG)	Y28	17	Epitomics (USA)	1:500
Histon H4 (Kaninchen IgG)	N/A	14	Imgenex (USA)	1:250
Acetyl-Histon H4 (Lys8, Kaninchen IgG)		~10	Upstate Biotechnology (USA)	1:500

Sekundärantikörper			Herkunft	Verd.
Ziege-Anti-Maus HRP			Upstate Biotechnology (USA)	1:5.000
Ziege-Anti-Kaninchen HRP			Upstate Biotechnology (USA)	1:5.000

Tabelle 11: Western Blot: HDACs, Histone und acetylierte Histone. Primär- und Sekundärantikörper mit Klon-, Herkunfts- und Verdünnungsangaben. Die Verdünnungen erfolgten im Antikörperpuffer.

3.5 Analyse relevanter Onkoproteine und Tumorsuppressoren

3.5.1 Intrazelluläre Expression von Onkoproteinen und Tumorsuppressoren – Western Blot Analyse

Um die molekularen Wirkmechanismen von VPA und IFN-alpha näher zu untersuchen, wurde ihr Einfluss auf die intrazelluläre Expression weiterer entscheidender Onkoproteine und Tumorsuppressoren mittels Western Blot Analysen (siehe 3.2.3) an Caki-1 Zellen evaluiert.

Primärantikörper	Klon	kDa	Herkunft	Verd.
β-Aktin (Maus IgG1)	AC-15	42	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)	1:1.000
Phospho-ERK1/2 (Maus IgG1)	20A	44/42	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:1.000
ERK1 (Maus IgG1)	MK12	44/42	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:5.000
ERK2 (Maus IgG2b)	33	42	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:5.000
Phospho-p38 MAPK (Maus IgG1)	36	42	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:2.500
p38α/SAPK2a (Maus IgG1)	27	42	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:5.000
Phospho-JNK (Maus IgG1)	41	43/56	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:250
pan-JNK/SAPK1 (Maus IgG1)	37	49	Becton Dickinson (Heidelberg)	1 : 250
Phospho-PTEN (Kaninchen, KLH)	44A7	54	Cell Signaling Technology (USA)	1:1.000
PTEN (Kaninchen, KLH)		54	Cell Signaling Technology (USA)	1:1.000
p53 (Maus IgG2b)	DO-7	53	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:500
p73 (Maus IgG1)	ER-15	73	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:500
c-myc (Maus IgG ₁)	9E10	62	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:250
PKBα/Akt (Maus IgG1)	55	59	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:500
Phospo-Akt (Maus IgG1)	104A2 82	60	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:500
Sekundärantikörper			Herkunft	Verd.
Ziege-Anti-Maus HRP			Upstate Biotechnology (USA)	1:5.000
Ziege-Anti-Kaninchen HRP			Upstate Biotechnology (USA)	1:5.000

Tabelle 12: Western Blot: Onkoproteine und Tumorsuppressoren. Primär- und Sekundärantikörper mit Klon-, Herkunfts- und Verdünnungsangaben. Die Verdünnungen erfolgten im Antikörperpuffer.

3.5.2 Expression von Onkoproteinen und Tumorsuppressoren nach EGF-Stimulation

Da NZK insbesondere durch die EGF- und VEGF-abhängigen Signalwege beeinflusst werden, wurde die intrazelluläre Expression verschiedener Proteine dieser Signalkaskaden sowie die Oberflächenexpression des EGF-Rezeptors nach EGF-Stimulation gemessen. VPA- und IFN-alpha-behandelte Tumorzellen wurden dazu 2 Stunden unter Serumentzug (Nährmedium ohne FBS) inkubiert und dann für 10 min mit EGF (10-20 ng/ml) stimuliert. Die Stimulation erfolgte in Kulturflaschen oder als Zellsuspension in 15 ml Falcon-Röhrchen. Danach wurden die Proteine für die Western Blot Analyse isoliert bzw. die Zellen für die Durchflusszytometrie geerntet.

3.5.2.1 Intrazelluläre Expression nach EGF-Stimulation

Der Nachweis der intrazellulären Expression von Proteinen der EGF- und VEGF-Signalkaskaden nach EGF-Stimulation erfolgte mittels Western Blot Analyse (siehe 3.2.3).

Primärantikörper	Klon	kDa	Herkunft	Verd.
β-Aktin (Maus IgG1)	AC-15	42	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)	1:1.000
Phospho-ERK1/2 (Maus IgG1)	20A	44/42	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:1.000
Phospho-p38 MAPK (Maus IgG1)	36	42	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:2.500
Phospho-JNK (Maus IgG1)	41	43/56	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:250
PKBα/Akt (Maus IgG1)	55	59	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:500
Phospho-Akt (Maus IgG1)	104A282	60	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:500
Phospho-EGF R (Maus IgG2a)	338324	190	R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt)	1:1.000
Sekundärantikörper			Herkunft	Verd.
Ziege-Anti-Maus HRP			Upstate Biotechnology (USA)	1:5.000

Tabelle 13: Western Blot: Proteine der EGF- und VEGF-Signalkaskaden. Primär- und Sekundärantikörper mit Klon-, Herkunfts- und Verdünnungsangaben. Die Verdünnungen erfolgten im Antikörperpuffer.

3.5.2.2 Oberflächenexpression des EGF-Rezeptors nach EGF-Stimulation

Die Oberflächenexpression des EGF-Rezeptors nach EGF-Stimulation wurde mit Hilfe der Durchflusszytometrie gemessen (siehe 3.3.5).

Primärantikörper	Klon	Herkunft	Verd.	Menge
Phospho-EGF R (Maus IgG2a)	338324	R&D Systems (Wiesbaden-Nordenstadt)	1:1.000	50 µl = 5 µg
Sekundär- antikörper	Klon	Herkunft	Verd.	Menge
FITC Zieg-Anti-Maus (multiple Adsorption)		Becton Dickinson (Heidelberg)	1:50	50 µl
Isotyp	Klon	Herkunft	Verd.	Menge
Maus IgG2a R-PE	G155- 178	Becton Dickinson (Heidelberg)	gebrauchsfertig	20 µl

Tabelle 14: Durchflusszytometrie: Oberflächenexpression des EGF-Rezeptors. Primär- und Sekundärantikörper sowie Isotypenantikörper mit Herkunfts-, Verdünnungs- und Mengenangabe.

3.6 Evaluierung der Genaktivität

Um den Einfluss von VPA und IFN-alpha auf die Genaktivität der Tumorzellen zu überprüfen, wurde die mRNA isoliert und mittels *Microarray*-Analyse untersucht. Evaluierete Veränderungen interessanter Gene wurden durch *RT qPCR (Real Time quantitative Polymerase Chain Reaction)* verifiziert.

3.6.1 RNA-Extraktion

Die RNA-Extraktion wurde mit dem „QIAshredder™ (250)“ und dem „RNeasy Mini Kit (250)“ von der Firma Qiagen durchgeführt.

Für die RNA-Extraktion wurden 75 cm²-Kulturflaschen mit konfluent gewachsenen Tumorzellen verwendet. Die Caki-1 Zellen wurden für 12 Stunden, 3 und 5 Tage mit VPA 0,25 mM bzw. 1 mM und/oder IFN-alpha 200 U/ml appliziert. Die Ablösung der Zellen erfolgte mit 3 ml Accutase und 7 ml PBS (ohne Ca²⁺ und Mg²⁺). Die Zellsuspension wurde in 15 ml Zentrifugenröhrchen überführt und 5 min bei 1.050 rpm und 4° C zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen, das Zellpellet in 1 ml RLT-Puffer (*RNA Lysis Tissue*-Puffer + 1 % Mercaptoethanol) resuspendiert. Das dabei entstandene Zelllysat wurde in QIAshredder pipettiert, die sich in 2 ml Sammelröhrchen befanden, und 2 min bei 14.000 rpm zentrifugiert. Dem homogenisierten Lysat wurden zur Präzipitation der RNA ein Volumen 70 %igen Ethanol zugeführt und kurz geschüttelt (Vortex). Das Lysat wurde in ein *RNeasy Mini Spin* überführt (maximal 700 µl), welches ebenfalls auf einem 2 ml Sammelröhrchen saß, und 15 sec bei 10.000 rpm zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde verworfen, die RNA war

nun an der Membran des *RNeasy Mini Spin* gebunden. Dieser Schritt wurde wiederholt, bis das gesamte Volumen aus dem QIAshredder aufgenommen war. Anschließend wurden 700 µl RW1-Puffer in die *RNeasy Mini Spin* mit der gebundenen RNA pipettiert. Erneut wurde 15 sec bei 10.000 rpm zentrifugiert und das Zentrifugat verworfen. Um eventuell noch vorhandene DNA zu entfernen, wurde ein DNA-Verdau mittels *RNase-Free DNase Set* durchgeführt. Zu diesem Zweck wurden für jede Probe 10 µl DNase mit 70 µl RDD-Puffer versetzt, auf die Membran mit der darin gebundenen RNA pipettiert und 15 min bei 30° C inkubiert. Danach wurde die Membran erneut mit 350 µl RW1-Puffer gewaschen bzw. 15 sec bei 10.000 rpm zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde dieses Mal samt Sammelröhrchen verworfen. Das *RNeasy Mini Spin* wurde in ein frisches 2 ml Sammelröhrchen gestellt. Dann wurden 500 µl RPE-Puffer (+ Ethanol) hinzugegeben und 15 sec bei 10.000 rpm zentrifugiert. Das Zentrifugat wurde verworfen. Nochmals wurden 500 µl RPE-Puffer hinzupipettiert und die Proben 2 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Das Zentrifugat samt Sammelröhrchen wurde verworfen, die *RNeasy Mini Spins* in 1,5 ml Sammelröhrchen gestellt. Für die Elution der RNA wurden 2 x 25-30 µl RNase-freies Wasser auf die Membran pipettiert, 2 min bei RT inkubiert und 1 min bei 10.000 rpm zentrifugiert. Die mRNA befand sich in gelöster Form in dem Sammelröhrchen und konnte direkt verarbeitet oder bei -80° C gelagert werden.

3.6.2 Quantitative Bestimmung des RNA-Gehalts

Der genaue RNA-Gehalt war entscheidend für die Durchführung von *Microarray*-Analysen und *RT qPCR*. Er konnte mittels Nanodrop ermittelt werden. Der Nanodrop maß den RNA-Gehalt in 1 µl isolierter RNA bei 260 nm Wellenlänge. Er berechnete den ng/µl Wert der jeweiligen RNA und gab Auskunft über die Reinheit der RNA (RNA:DNA Ratio, Wellenlänge 260 nm:280 nm). Verwendung fanden ausschließlich Proben mit einer RNA:DNA Ratio ~2.

3.6.3 Qualitätskontrolle der RNA

Die RNA-Qualität wurde in einem 1 %igen Agarosegel und mittels Messung am Bioanalyser überprüft.

Für den Gellauf wurde ein 1 %iges Agarosegel gegossen. Die zu verwendenden Gelkammern und Kämmen wurden vor dem Gebrauch von möglichen RNasen gereinigt. Jeweils 1 µl Probe wurde mit 2 µl Agarosegel *Loading Dye* und 7 µl destilliertem Wasser versetzt. Die 10 µl wurden auf dem Gel aufgetragen. Die Auftrennung erfolgte bei 125 V für 30 min in 1 x TAE-Puffer (50 x verdünnt in

destilliertem Wasser). Die Quantifizierung der Expression der für die RNA-Qualität aussagekräftigen 18S- und 28S-Banden konnten mittels Transilluminator unter dem UV-Licht sichtbar gemacht werden. Die Fragmentgröße konnte aufgrund der auf dem Agarosegel mit aufgetragenen 100 bp DNA-*Ladder* kontrolliert werden. Die Qualität der RNA lies sich aufgrund des Vorhandenseins beider Banden und deren Intensität ermitteln.

Eine sehr genaue quantitative und qualitative Bestimmung der RNA war mit dem Bioanalyser möglich. Hier fanden der Bioanalyser von Agilent und das RNA 6000 Nano *Kit* Verwendung. Die Durchführung und Messung erfolgte nach dem Herstellerprotokoll (RNA 6000 Nano *Kit Guide*, Agilent). Mittels des Bioanalysers wurde zum einen der Anteil an 18S- und 28S-RNA auf einem Gel dargestellt und die Ratio (28S/18S) ermittelt, zum anderen der RNA-Gehalt in ng/µl und die RNA *integrity number* (RIN) bestimmt. Die RIN verändert sich mit dem 18S- und 28S-RNA-Gehalt. Höchste RIN ist 10 und steht für eine optimale RNA Qualität, d. h. keine Degradation der RNA oder DNA-Kontamination. Die RIN der verwendeten Proben betrug ~9.

3.6.4 Microarray-Analyse

Microarray-Analysen dienen dem Nachweis der Genexpression. Mittels des von uns verwendeten Affymetrix *GeneChip HT Human Genome U133 Array Plate Set* konnte die Expression von ~39.000 Transkripten des humanen Genoms, inklusive 33.000 gut charakterisierter Gene sowie UniGene und deren Veränderungen evaluiert werden.

3.6.4.1 Target Preparation

Für die *Target Preparation* wurden 2 µg der Ausgangs-RNA eingesetzt. Die Durchführung erfolgte mit Hilfe der *GeneChip Array Station* nach dem Herstellerprotokoll (*Expression Analysis Technical Manual for HT Array Plates using the GeneChip Array Station*). Während des Prozesses wurde die RNA in cDNA translatiert, mittels Spektrophotometer quantifiziert, dann normalisiert und fragmentiert. Endprodukt waren die Hybridisierungs-fertigen Proben. Diese konnten sofort weiter verarbeitet oder bei -80° C eingefroren und gelagert werden.

3.6.4.2 Hybridisierung

Bei diesem Schritt hybridisierten die fragmentierten cRNAs an Oligonukleotide auf den *Chips* der HT Arrayplatten. Nach der Vorbereitung der HT Arrayplatten und Proben sowie der Zusammenführung dieser durch die Arraystation nach dem Herstellerprotokoll, erfolgte für 16 Stunden die eigentliche Hybridisierung im Hybridisierungssofen bei 48° C.

3.6.4.3 Färbung

Im nächsten Schritt wurde die nicht hybridisierte cRNA von den *Chips* der HT Arrayplatte gewaschen und die verbleibende hybridisierte cRNA mittels eines biotiniertem Antikörpers sichtbar gemacht. Entgegen der Angabe im Herstellerprotokoll wurde für die Färbung das *Stain Module* aus dem *GeneChip Hybridization, Wash and Stain Kit* verwendet. Ferner wurden anstelle der vorgegebenen *Low* und *High Stringency* Puffer Waschpuffer A und B von Affymetrix eingesetzt. Die Durchführung des Wasch- und Färbeprozesses sowie die Überführung der *Chips* in eine *Scan*-Platte erfolgten durch die Arraystation.

3.6.4.4 Scan und Qualitätskontrolle der Chips

Die *Chips* wurden im *GeneChip HT Array Plate Scanner* eingescannt und die gewonnenen Daten mit der *GeneChip Operating Software* (GCOS) auf ihre Qualität überprüft.

3.6.4.5 Normalisierung der Daten

Um die gewonnenen Daten der jeweiligen Probenexpression miteinander vergleichen zu können, mussten diese normalisiert werden. Die Normalisierung wurde mit dem *Microarray Analysis Suite* (MAS5) durchgeführt.

3.6.4.6 Unsupervised Analyse

Aus den Daten der Expressionsprofile wurden in der *unsupervised* Analyse Übereinstimmungen der Expression von Transkripten innerhalb der unterschiedlichen Proben detektiert (=> *Cluster*). Diese zeigten die Korrelation und Verknüpfung zwischen den verschiedenen Proben auf. Die Darstellung erfolgte in Form eines Dendrogramms.

3.6.4.7 Supervised Analyse

Die *supervised* Analyse der Genexpression ermöglichte die Evaluierung signifikant unterschiedlich exprimierter Gene ($p < 0,05$). Stringent wurden nur Expressionsunterschiede mit LCB (*lower confidence bound*) des *fold change* $> 1,2$ berücksichtigt. Der LCB gilt als ein zuverlässiges Bewertungskriterium des *fold change* und ist von hohem statistischem Stellenwert (Li et al. 2001). Untersuchungen haben gezeigt, dass der LCB $> 1,2$ in der Regel mit einem tatsächlichen *fold change* von minimum 3 korrespondiert (Ramalho-Santos et al. 2002). Die funktionelle Analyse der Gene und die Bildung von Gengruppen erfolgten mittels DAVID (*database for annotation, visualization and integrated discovery*). Des Weiteren konnten mittels *Venn Diagram Generator* die Expressionsprofile verschiedener Proben miteinander verglichen und auf Schnittmengen überprüft sowie durch IPA (*ingenuity pathway analysis upgrade advisor*) die von den Veränderungen betroffenen Signalwege ermittelt werden. Die SOM (*self-organized map clustering*) Analyse gab Aufschluss darüber, wie sich das Expressionsverhalten bestimmter Gene nach unterschiedlicher Behandlung verhielt, graphisch dargestellt in sogenannten *Heatmaps* bzw. Farbdigrammen. Mittels Literaturrecherche wurden zudem die funktionellen Bedeutungen sowie Beziehungen und somit der Einfluss der veränderten Gene auf die biologischen Mechanismen evaluiert

3.6.5 Quantitative Echtzeit Polymerase Kettenreaktion = Real Time quantitative Polymerase Chain Reaktion (RT qPCR)

Mittels RT qPCR konnte die Expression einzelner Gene evaluiert und somit Ergebnisse aus den *Microarray*-Analysen verifiziert werden.

3.6.5.1 cDNA-Synthese

Für die Durchführung der *RT qPCR* war die Umschreibung der Ausgangs-RNA in cDNA Voraussetzung. Die cDNA Synthese erfolgte mittels *AffinityScript QPCR cDNA Synthesis Kit* von der Firma Stratagene nach dem Herstellerprotokoll. Dabei wurden 3 µg Ausgangs-RNA je Probe eingesetzt.

3.6.5.2 quantitative Genexpressionsanalyse

Die RT qPCR war die derzeit sensitivste Methode zur Analyse von Genexpressionen. Verwendung fand das *SYBR-Green SuperArray* nach dem RT² qPCR Primer Assays Protokoll. Folgende Primer kamen zum Einsatz:

Primer	bp	UniGen Nr.	Referenz Sequenz Zugangs-Nr.	Referenz Position
GAPDH	175	Hs. 544577	NM_002046.3	1287-1310
ITGA2	143	Hs. 482077	NM_002203.3	6362-6385
ITGA4	96	Hs. 694732	NM_000885.4	4385-4405
ITGA5	106	Hs. 505654	NM_002205.2	3957-3978
ITGA6	184	Hs. 133397	NM_000210.2	5261-5283
ITGA7	209	Hs. 524484	NM_002206.1	40-60
ITGB6	164	Hs. 470399	NM_000888.3	1827-1845
CD44	106	Hs. 502328	NM_000610.3	602-622
NCAM1	151	Hs. 503878	NM_000615.5	5175-5195
VCAM1	141	Hs. 109225	NM_001078.2	2855-2879
ICAM1	122	Hs. 707983	NM_000201.2	1888-1906
CCL2	96	Hs. 303649	NM_002982.3	384-402
CCL5	110	Hs. 514821	NM_002985.2	391-411
CXCL1	83	Hs. 789	NM_001511.1	505-527
CXCL2	179	Hs. 590921	NM_002089.3	878-897
CXCL10	111	Hs. 632586	NM_001565.2	745-765
CXCL11	161	Hs. 632592	NM_005409.3	724-745
CXCL16	177	Hs. 708201	NM_022059.2	1078-1096
CXCR4	150	Hs. 593413	NM_003467.2	172-192

Tabelle 15: RT qPCR: Primer für das RT² qPCR Primer Assay mit Basenpaar (bp)-, Gen-, Referenzsequenz und Referenzpositions-Angaben. GAPDH = Haushaltsgen (Kontrolle), ITGA = Integrin alpha-Subtypen, ITGB = Integrin beta-Subtyp, CD44, NCAM1, VCAM1, ICAM1 = Zelladhäsionsmoleküle, CCL & CXCL = Chemokine, CXCR = Chemokin-Rezeptor. Die aufgeführten Primer stammten alle von der Firma *SABioscience Corporation*.

Die RT qPCR erfolgte am Mx3005p von Stratagene. Die eigentliche Analyse der jeweiligen Genexpressionen wurde mittels $\Delta\Delta C_t$ Methode im Analyseprogramm der *SABioscience Corporation* durchgeführt.

3.7 Tierexperimentelle Studien

3.7.1 Analyse des Tumorwachstums in vivo

Die Tierexperimentellen Studien dienen der Ergänzung der in vitro Modelle und der Vertiefung des Bezugs zur Klinik. Die Studien wurden in enger Kooperation mit der *Experimental Pharmacology & Oncology GmbH* (EPO, Berlin) durchgeführt. Immundefiziente Nacktmäuse wurden dazu xenogen mit 10^7 Caki-1 Tumorzellen transplantiert. Die VPA- und IFN-alpha-Behandlung begann, wenn die Tumoren palpabel geworden waren. Folgende Therapiegruppen wurden untersucht:

- Kontrollgruppe (n = 10): A) Behandlung mit PBS (mit Ca^{2+} und Mg^{2+})
Therapiegruppen (n = 8): B) VPA (200 mg/kg/Tag, i.p.)
 C) VPA (400 mg/kg/Tag, i.p.)
 D) IFN-alpha (500.000 U/kg/Tag)
 E) VPA (wie B) + IFN-alpha (wie D)
 F) VPA (wie C) + IFN-alpha (wie D).

Die Tiere wurden getötet, wenn ein Therapieeffekt erfassbar war, sie moribund wurden bzw. das Tumorgewicht 10 % des Körpergewichts überstieg. Die Tumorgroße wurde in regelmäßigen Abständen überprüft und abschließend die durchschnittlichen, medianen und relativen Tumorumfänge bestimmt. Die Tumorproben wurden schockgefroren und zur Proteinisolierung für Western Blot Analysen aufbereitet. Mittels dieser konnten durch VPA und IFN-alpha ausgelöste Unterschiede in der Expression von Proteinen nachgewiesen werden.

3.7.2 Intrazelluläre Proteinexpression in vivo

Zur Evaluierung der molekularbiologischen Wirkmechanismen, die mit der Reduktion des Tumorumfanges einherging, wurde die intrazelluläre Expression von HDACs, Histonen, acetylierten Histonen, Zellzyklus- und Apoptoseproteinen mittels Western Blot Analyse untersucht. Die Proteine wurden wie im Folgenden beschrieben aus dem Gewebe extrahiert.

Protein-Extraktion aus Gewebe

Das bei -80°C gekühlte Gewebe wurde zunächst in Flüssigstickstoff überführt, dann in einen *dounce homogenisator* gegeben und in diesem zerkleinert. In einer vorgekühlten Schale mit Flüssigstickstoff erfolgte die Pulverisierung mittels eines Mörsers. Das Pulver wurde in vorgekühlte Falcon-Röhrchen mit je 1 ml Lysispuffer

(1 ml + 5 µl PMSF, Tab. 4) überführt, gevortext und 30 min auf Eis ruhen gelassen. Das im Lysispuffer gelöste Homogenisat wurde in vorgekühlte Ultrazentrifugenröhrchen pipettiert und in der Ultrazentrifuge bei 14.770 rpm bei 4° C für 30 min zentrifugiert. Der Überstand wurde in Kryoröhrchen pipettiert und direkt weiter verarbeitet oder bei -80° C gelagert.

Die eigentliche Western Blot Analyse wurde wie zuvor beschrieben (siehe 3.2.3) durchgeführt.

Primärantikörper	Klon	kDa	Herkunft	Verd.
β-Aktin (Maus IgG1)	AC-15	42	Sigma-Aldrich (Taufkirchen)	1:1.000
Histondeacetylase 3 (Kaninchen)		48	Biomol GmbH (Hamburg)	1:2.000
Histondeacetylase 4 (Kaninchen)		140/ 110	Biomol GmbH (Hamburg)	1:500
Histon H3 (Kaninchen IgG)	Y173	17	Epitomics (USA)	1:5.000
Acetyl-Histon H3 (Kaninchen IgG)	Y28	17	Epitomics (USA)	1:500
Histon H4 (Kaninchen IgG)	N/A	14	Imgenex (USA)	1:250
Acetyl-Histon H4 (Lys8, Kaninchen IgG)		~10	Upstate Biotechnology (USA)	1:500
Cdk1/Cdc2 (Maus IgG1)	1/Cdk1/ Cdc2	34	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:2.500
Cdk4 (Maus IgG1)	97	33	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:250
Cyclin B (Maus IgG1)	18/ Cyclin B	62	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:1.000
Cyclin D1 (Maus IgG1)	G124- 326	36	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:250
Cyclin D3 (Maus IgG2b)	1	33	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:1.000
Rb (Maus IgG2a)	2	110	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:250
p21 (Maus IgG1, K)	2G12	21	Becton Dickinson (Heidelberg)	1:250
Bcl2 (Kaninchen IgG)	N-19	28	Santa Cruz Biotechnology (USA)	1:200
Bax (Kaninchen IgG)	N-20	23	Santa Cruz Biotechnology (USA)	1:200

Sekundärantikörper			Herkunft	Verd.
Ziege-Anti-Maus HRP			Upstate Biotechnology (USA)	1:5.000
Ziege-Anti-Kaninchen HRP			Upstate Biotechnology (USA)	1:5.000

Tabelle 16: Western Blot: Tierexperimentelle Studien. HDACs, Histone und acetylierte Histone sowie Zellzyklus- und Apoptoseproteine. Primär- und Sekundärantikörper mit Klon-, Herkunfts- und Verdünnungsangaben. Die Verdünnungen erfolgten im Antikörperpuffer.

3.8 Statistik

Für die Daten der funktionellen Untersuchungen und der FACS-Analyse wurden die Mittelwerte +/- Standardabweichung berechnet. Sämtliche Ergebnisse wurden 5-7 Mal wiederholt. Die Prüfung auf statistische Signifikanz erfolgte durch den "Wilcoxon-Mann-Whitney-U-Test". Dieser Test erlaubt es zwei unabhängige Daten-
gruppen bei einer nicht normalverteilten Grundgesamtheit miteinander zu vergleichen. Da biologische Phänomene selten der Gauß'schen Normalverteilung folgen, empfiehlt sich dieser nicht parametrische Test. Differenzen wurden dabei als signifikant gewertet, wenn $p < 0,05$ war.

4 Ergebnisse

4.1 Vorstudien – Dosisfindung

Die Dosis-Wirkungs-Beziehungen von VPA und IFN-alpha wurden mittels Proliferations- und Adhäsionsstudien evaluiert. Die NZK-Zelllinien Caki-1, A498 und KTCTL-26 wurden dazu unterschiedlich lange mit verschiedenen Konzentrationen von VPA oder IFN-alpha vorbehandelt.

4.1.1 VPA: Dosis-Wirkungs-Analyse

VPA wurde in den Konzentrationen 0,25 mM, 0,5 mM und 1 mM appliziert. Die Quantifizierung der Proliferation erfolgte 24 und 48 Stunden nach Ausplattierung der Zellen in 96-Loch-Platten. Zur Vergleichbarkeit des Proliferationsverhaltens wurden die 24 Stundenwerte auf 100 % gesetzt und die Daten der 48 Stunden entsprechend in Prozentwerte umgerechnet (Abb. 4).

Direkt nach VPA-Zugabe waren keine Effekte auf das Wachstumsverhalten detektierbar (Daten nicht gezeigt). Eine längere Vorinkubation von 3 und 5 Tagen resultierte hingegen in deutlichen Veränderungen gegenüber den unbehandelten Kontrollen (Abb. 4). Bereits die 3-tägige Vorinkubation mit VPA resultierte Konzentrations-abhängig in einer signifikanten Hemmung der Tumorzellproliferation. Diese anti-proliferativen Effekte waren nach 5 Tagen Vorbehandlung mit VPA deutlich verstärkt. VPA 1 mM induzierte dabei die maximale Wachstums-Blockade.

Ebenso initiierte die Vorbehandlung der NZK-Zellen mit VPA Konzentrations-abhängig eine signifikante Verringerung der Adhäsion der Tumorzellen an Endothel (Abb. 5). Dieser Effekt zeigte sich nach 3 Tagen jedoch erst bei einer VPA-Konzentration von 0,5 mM und 1 mM. VPA 0,25 mM bewirkte keine Veränderung zur Kontrolle. Nach 5-tägiger VPA-Applikation induzierte auch die Gabe von VPA 0,25 mM bei allen Zelllinien eine signifikante Hemmung der Tumoranheftung an Endothel.

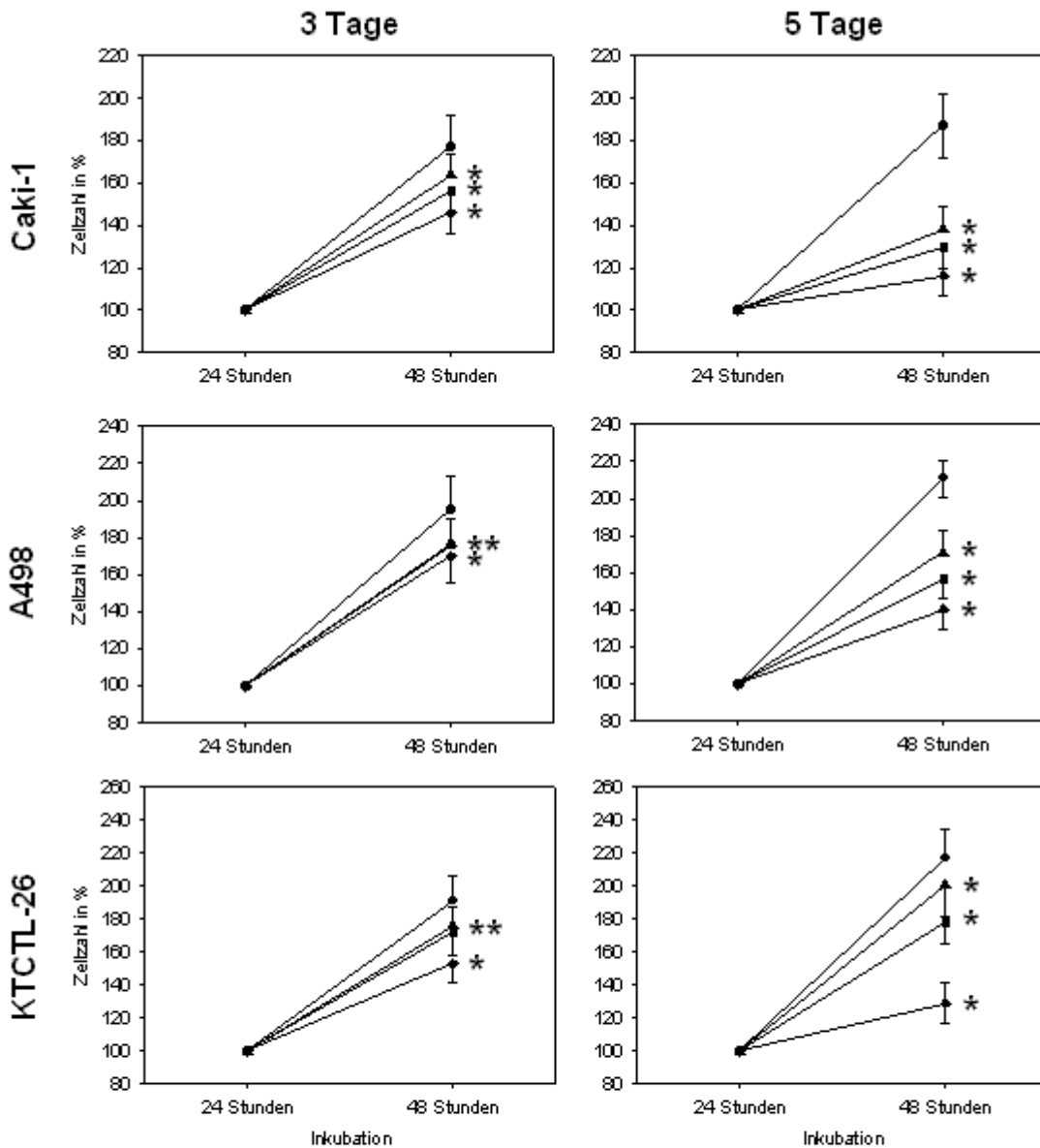


Abbildung 4: VPA-Dosisfindung: Proliferation mittels MTT-Assay. Verschiedene NZK-Zelllinien. 3- und 5-tägige Applikation mit VPA 0,25 mM, 0,5 mM und 1 mM. Nach 24 und 48 Stunden Inkubation in 96-Loch-Platten. Anzahl der Zellen in Prozent. 24 Stunden Werte auf 100 % gesetzt. Konzentrations-abhängige signifikante Abnahme der Zellzahl gegenüber den unbehandelten Kontrollzellen. Effekte waren nach 5 Tagen Vorbehandlung stärker ausgeprägt. Durchschnittswerte aus $n = 6$ Versuchen mit Standardabweichung und Signifikanz *.

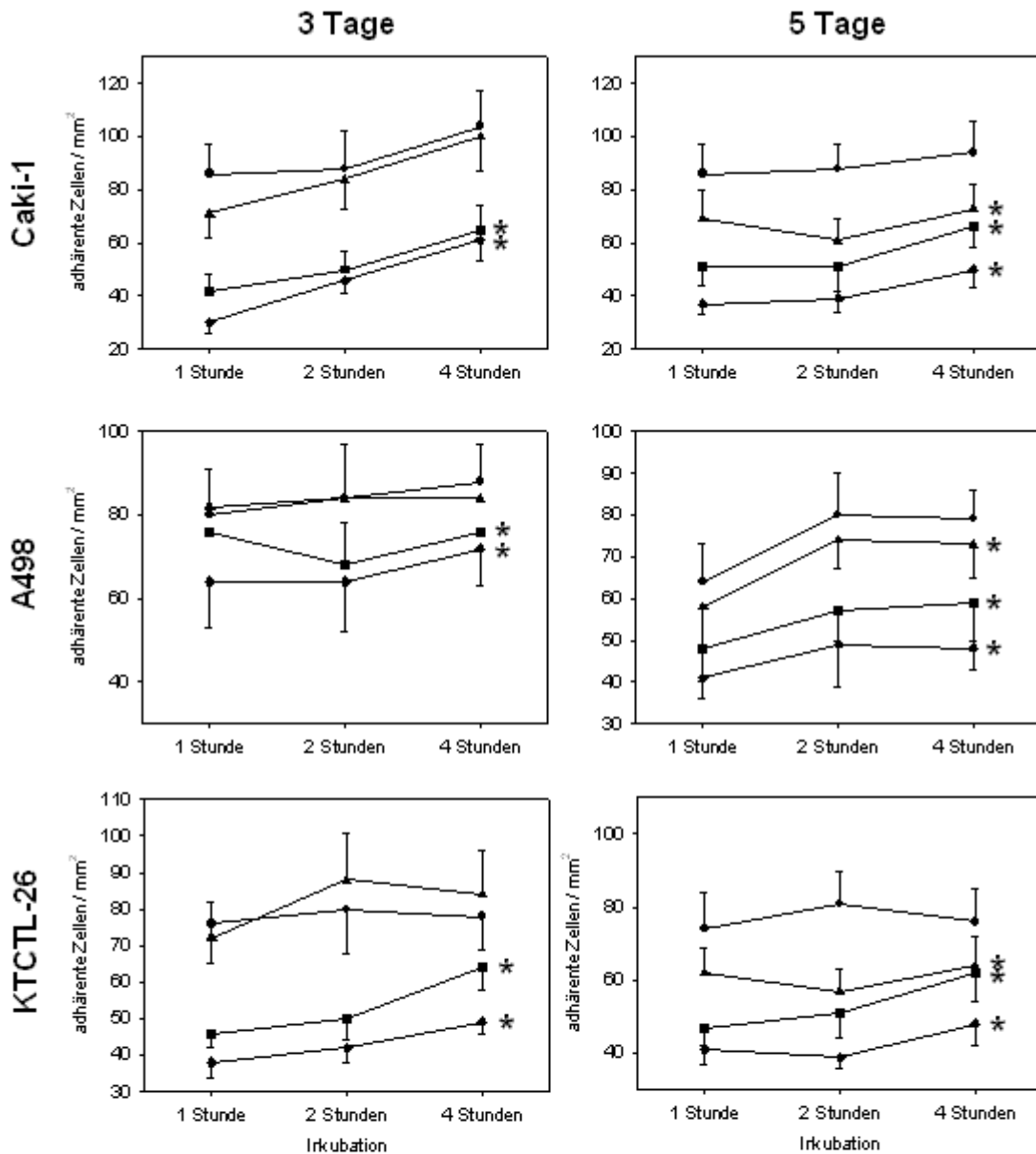


Abbildung 5: VPA-Dosisfindung: Adhäsion an Endothel. Verschiedene NZK-Zelllinien. 3- und 5-tägige Applikation mit VPA 0,25 mM, 0,5 mM und 1 mM. Anzahl der adhärenen Zellen nach 1, 2 und 4 Stunden Inkubation auf Endothel. Mit zunehmender VPA-Konzentration nahm die Anzahl der adhärenen Tumorzellen im Vergleich zu unbehandelten Kontrollzellen signifikant ab. Nach 5 Tagen Behandlung waren deutlichere Effekte zu verzeichnen. Gezählt wurden jeweils 3-5 Sichtfelder von 0,25 mm² bei 200-facher Vergrößerung des Mikroskops. Durchschnittswerte aus n = 6 Versuchen mit Standardabweichung und Signifikanz *.

Die Vitalität der Zellen, nachgewiesen mittels Trypanblau-Färbung, verblieb mit durchschnittlich 95 % bei allen VPA-Konzentrationen gegenüber den Kontrollen unverändert.

Für sämtliche nachfolgenden Kombinationsversuche wurde die VPA-Konzentration von 0,25 mM gewählt, die minimale Effekte erzielte. Ferner wurde die Konzentration von VPA 1 mM verwendet, die maximale Wirkung bei den Tumorzellen hervorrief.

4.1.2 IFN-alpha: Dosis-Wirkungs-Analyse

Zur Evaluierung der Dosis-Wirkungs-Beziehung von IFN-alpha wurden die Tumorzellen 3 und 5 Tage mit ≤ 200 U/ml vorbehandelt.

Die Behandlung der NZK-Zellen mit IFN-alpha allein zeigte bei 200 U/ml keinen Effekt auf die Proliferation und Adhäsion der Tumorzellen. 2.000 U/ml IFN-alpha induzierte hingegen eine signifikante Inhibition der Proliferation und Adhäsion an Endothel (Daten nicht gezeigt). Studien belegen, dass IFN-alpha vor allem in einem Konzentrationsbereich, in dem es selbst keine biologischen Effekte induziert, die Wirkung anti-tumoraler Substanzen steigern kann (Lee et al. 2006, Cinatl et al. 2002, Lucero et al. 2001, Okamoto et al. 1996). Aufgrund dessen wurde IFN-alpha für die nachfolgenden Versuche in einer Konzentration von 200 U/ml verabreicht.

Da alle verwendeten NZK-Zelllinien ein vergleichbares Proliferations- und Adhäsionsverhalten aufwiesen, konzentrierten sich alle Folgeversuchen auf Caki-1 als repräsentative Zelllinie.

4.2 Anti-proliferative Wirkung von VPA und IFN-alpha

Die unkontrollierte Proliferation ist ein Hauptmerkmal von malignen Tumoren. Daher sollte in Proliferationsstudien das Wachstumsverhalten der Caki-1 Zellen nach VPA und IFN-alpha Behandlung evaluiert werden. Um funktionelle Effekte von VPA und IFN-alpha auch von „normalen“ Nierenzellen zu überprüfen, wurden zum Vergleich PTC-Zellen behandelt und ihr Proliferationsverhalten analysiert. Die Quantifizierung erfolgte 24, 48 und 72 Stunden nach Ausplattierung der Zellen. Die 3- und 5-tägige Applikation mit VPA 0,25 mM rief eine signifikante Inhibition gegenüber den Kontrollen hervor, die durch VPA 1 mM deutlich erhöht wurde (Abb. 6). Die korrespondierenden Kombinationen mit IFN-alpha resultierten in einem weiteren anti-proliferativen Effekt. IFN-alpha 200 U/ml allein bewirkte dabei keine Wachstums-Hemmung. Nach 5-tägiger Behandlung war die Proliferations-Inhibition insgesamt stärker ausgeprägt als nach 3 Tagen. Die Unterschiede nahmen dabei in Abhängigkeit von der Inkubationszeit in der 96-Loch-Platte zu. So waren 72 Stunden nach Ausplattierung die jeweils deutlichsten Effekte zu verzeichnen.

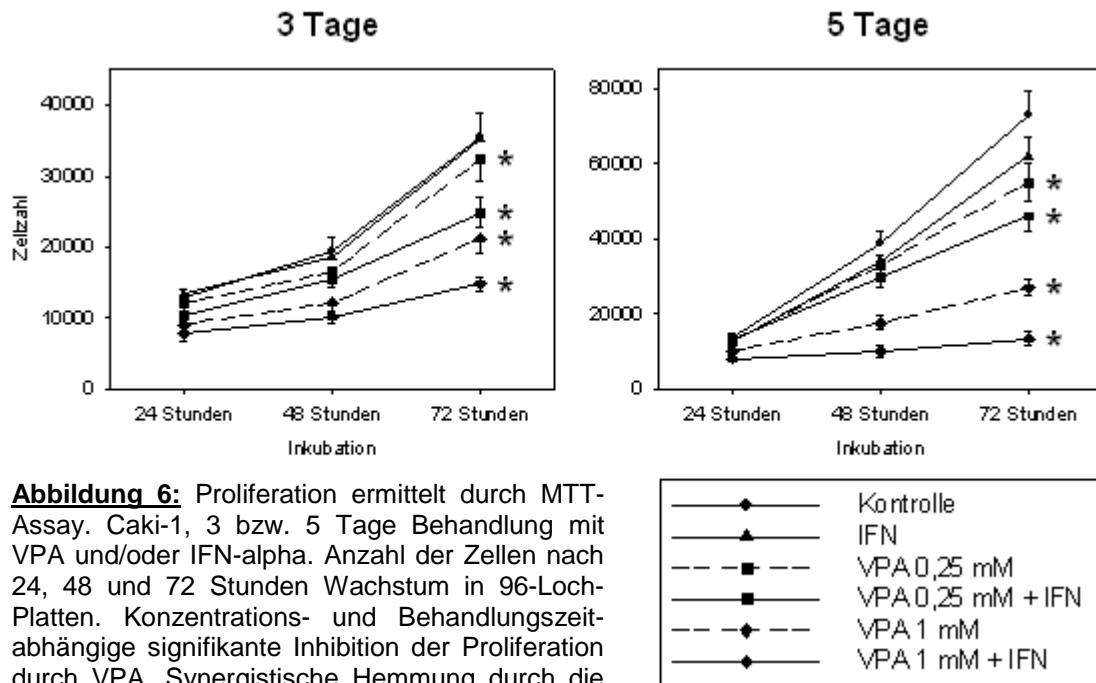


Abbildung 6: Proliferation ermittelt durch MTT-Assay. Caki-1, 3 bzw. 5 Tage Behandlung mit VPA und/oder IFN-alpha. Anzahl der Zellen nach 24, 48 und 72 Stunden Wachstum in 96-Loch-Platten. Konzentrations- und Behandlungszeit-abhängige signifikante Inhibition der Proliferation durch VPA. Synergistische Hemmung durch die Kombinationsbehandlung. IFN-alpha allein rief dabei keine signifikante Veränderung hervor. Durchschnittswerte aus $n = 5$ Versuchen mit Standardabweichung und Signifikanz *.

PTC-Zellen zeigten keine Veränderung in der Proliferation durch VPA und/oder IFN-alpha (Daten nicht gezeigt).

4.3 Apoptoseinduktion durch VPA und IFN-alpha im Nierenzellkarzinom

Apoptotische Ereignisse können für die Verringerung der Zellzahl verantwortlich sein. Konsequenterweise wurden daher die Caki-1 Zellen auf Apoptose untersucht. Der Nachweis erfolgte mittels Bestimmung von Annexin V und Caspase 3. In der Messung nach Annexin V-FITC- und Propidiumiodid-Zugabe konnten keine Veränderung des prozentualen Anteils an apoptotischen Zellen nach Behandlung gegenüber den Kontrollen detektiert werden (Abb. 7). Die vitalen Zellen stellten im Durchschnitt 90 %, nekrotische und spät apoptotische Zellen jeweils 4 % und früh apoptotische Zellen 2 %.

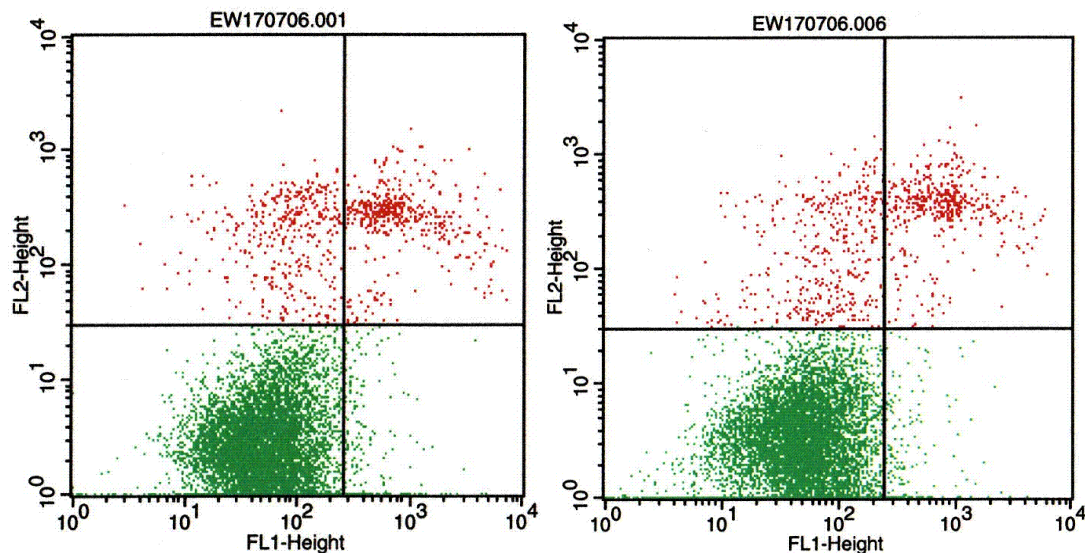


Abbildung 7: Apoptose: Annexin V-FITC- und Propidiumiodid-Färbung, Bestimmung mittels Durchflusszytometrie. Repräsentativ Caki-1 Zellen nach 3 Tagen Vorbehandlung. *Scatter Plot*: links: Kontrolle; rechts: + VPA 1 mM + IFN 200 U/ml. Jeweilige Verteilung früh apoptotischer (2 %, unten rechts), spät apoptotischer (4 %, oben rechts), vitaler (90 %, unten links) und nekrotischer (4 %, oben links) Caki-1 Zellen. Repräsentativ aus n = 3 Versuchen.

Auch der quantitative Nachweis aktiver Caspase-3 zeigte nach der Behandlung mit VPA und IFN-alpha keine Erhöhung des Caspasegehalts in Caki-1 Zellen an (Daten nicht gezeigt).

4.4 Inhibition der Adhäsion - biologische Analysen

4.4.1 Adhäsion an Endothelzellen (HUVEC)

Im Kokultursystem wurde die Anheftung der NZK-Zellen an HUVEC-Zellen evaluiert. Um Effekte der Substanzen auf die Adhäsion „normaler“ Nierenzellen auszuschließen, wurden PTC-Zellen analog mitbehandelt und untersucht. Die Einzelapplikation von VPA 0,25 mM bewirkte erst nach 5-tägiger Behandlung eine signifikante Abnahme des Adhäsionsverhaltens gegenüber der Kontrolle (Abb. 8, rechts). Die korrespondierende Kombination mit IFN-alpha rief dabei eine weitere Inhibition der Tumoranheftung hervor. VPA 1 mM hingegen induzierte bereits nach 3 Tagen eine signifikante Reduktion der Anzahl adhärenter Caki-1 am Endothel (Abb. 8, links). Auch hier resultierte die Kombination mit IFN-alpha eine Reduktion der Tumoranheftung. Die Einzelgabe von IFN-alpha führte hingegen zu keinem Zeitpunkt zu einer Verringerung der adhärenter Tumorzellen an Endothel. Die Graphen der 3-tägigen Applikation mit VPA 0,25 mM und der respektiven Kombination wurden der Übersichtlichkeit wegen nicht in dem Liniendiagramm aufgenommen, da sie den Kontrollen entsprachen (Abb. 8, links).

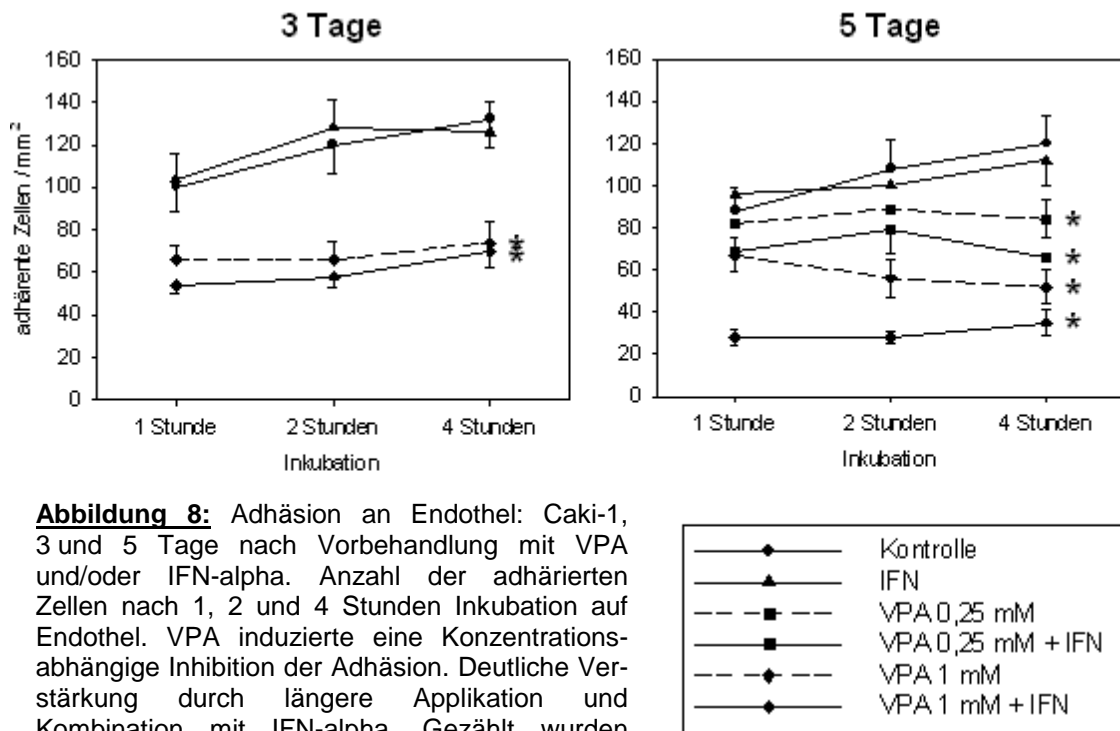


Abbildung 8: Adhäsion an Endothel: Caki-1, 3 und 5 Tage nach Vorbehandlung mit VPA und/oder IFN-alpha. Anzahl der adhärenen Zellen nach 1, 2 und 4 Stunden Inkubation auf Endothel. VPA induzierte eine Konzentrationsabhängige Inhibition der Adhäsion. Deutliche Verstärkung durch längere Applikation und Kombination mit IFN-alpha. Gezählt wurden jeweils 3–5 Sichtfelder von 0,25 mm² bei 200-facher Vergrößerung des Mikroskops. Durchschnittswerte aus n = 5 Versuchen mit Standardabweichung und Signifikanz *.

Abbildung 9 zeigt repräsentativ die inhibitorischen Effekte auf die Adhäsion von Caki-1 5 Tage nach Applikation und einer Stunde Inkubation auf Endothel (Abb. 9).

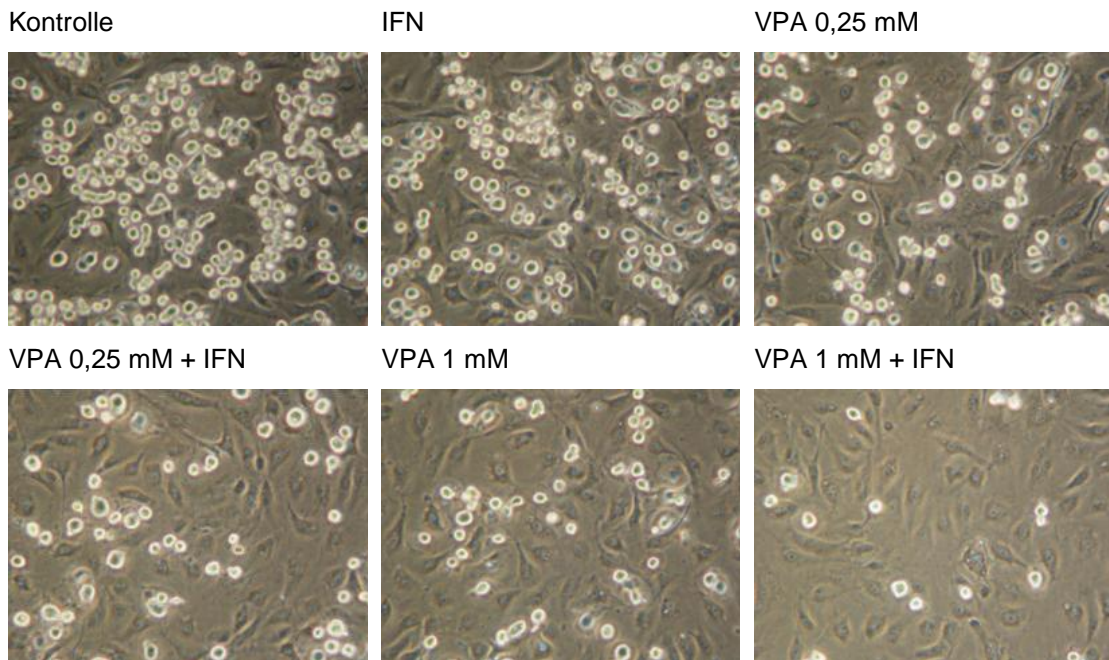


Abbildung 9: Adhäsion an Endothel: Fotografien der Assays. Caki-1, 5 Tage nach Vorbehandlung mit VPA 0,25 mM bzw. 1 mM und/oder IFN-alpha 200 U/ml. 1 Stunde nach Inkubation auf Endothel. Signifikante Inhibition der Adhäsion nach den jeweiligen VPA- und den korrespondierenden Kombinationsbehandlungen mit IFN. Aufnahme bei 200-facher Vergrößerung des Mikroskops und F3,3 der Kamera.

Für PTC-Zellen konnte im Gegensatz zu Caki-1 Zellen keine Veränderungen im Adhäsionsverhalten an Endothel unter VPA und/oder IFN-alpha detektiert werden (Daten nicht gezeigt).

4.4.2 Adhäsion an extrazelluläre Matrixproteine (EZM)

Die Interaktion mit EZM ist ein weiterer wichtiger Indikator für das Invasionspotential der Tumorzellen. Daher wurde zusätzlich zu den Adhäsionsstudien an Endothel das Adhäsionsverhalten an die extrazellulären Matrixproteine (EZM) Kollagen-G, Fibronectin und Laminin evaluiert. Poly-D-Lysin beschichtete und unbeschichtete Platten dienten als Negativkontrollen, um unspezifische Bindungen ausschließen oder verrechnen zu können. Zeit- und Konzentrations-abhängig resultierte die VPA-Applikation in deutlichen inhibitorischen Effekten auf das Adhäsionsverhalten der Caki-1 Zellen an Kollagen-G und Fibronectin verglichen mit den Kontrollen (Abb. 10). Die korrespondierenden Kombinationen mit IFN-alpha resultierten ebenfalls in einer signifikanten Reduktion der Anzahl adhärenter Caki-1 Zellen. In Gegenwart von Kollagen-G zeigte sich dabei eine weitere Hemmung der Tumoranheftung. Die Einzelgabe von IFN-alpha induzierte keinen nennenswerten inhibitorischen Effekt. Bei der Adhäsion an Fibronectin bewirkte die Kombination keine Verstärkung der Reduktion adhärenter Caki-1 gegenüber der VPA-Monobehandlung. Interessanterweise löste IFN-alpha allein nach 5 Tagen eine deutliche Blockade der Tumoranheftung aus. Die Adhäsion an Laminin war insgesamt deutlich schwächer ausgeprägt als an Kollagen-G und Fibronectin. Weder VPA noch IFN-alpha induzierten hier eine Modulation der Adhäsionseigenschaften von Caki-1 Zellen.

Die Tumorzellanheftung an Poly-D-Lysin war gering und von der Behandlung unbeeinflusst (Abb. 10). An die unbeschichtete Platte adhärten nur vereinzelte Zellen, auch hier resultierte die Behandlung in keiner Veränderung (Daten nicht gezeigt). Damit konnte eine unspezifische Beeinflussung des Adhäsionsverhaltens der Caki-1 Zellen ausgeschlossen werden.

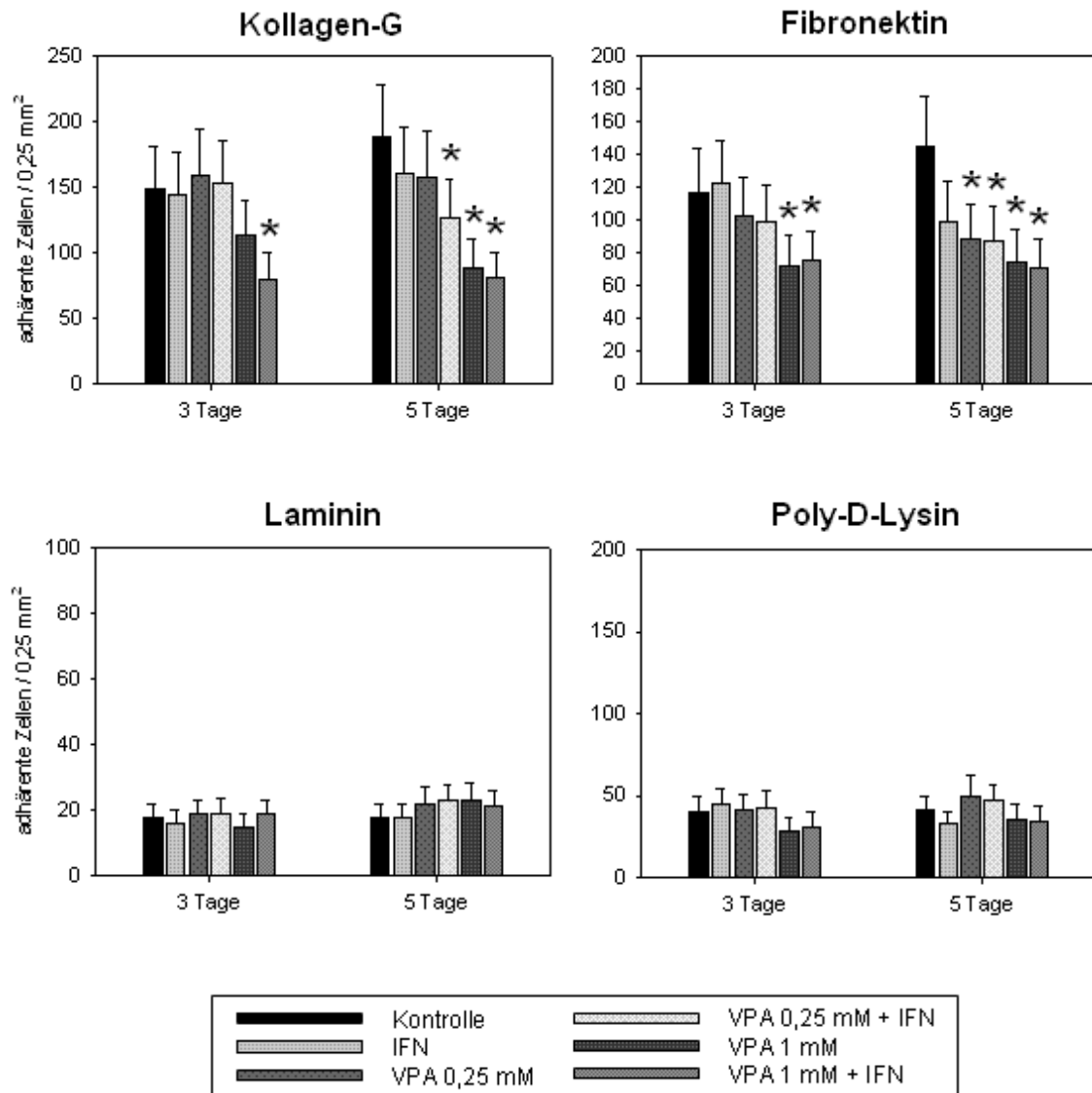


Abbildung 10: Adhäsion an EZM: Caki-1 nach 3- und 5-tägiger Vorbehandlung mit VPA 0,25 mM bzw. 1 mM und/oder IFN-alpha 200 U/ml. Adhäsion auf Kollagen-G (400 µg/ml), Fibronektin (100 µg/ml) und Laminin (50 µg/ml). Kontrollen: Poly-D-Lysin. Nach 30 min Inkubation. Gezählt wurden jeweils 3–5 Sichtfelder von 0,25 mm² bei 200-facher Vergrößerung des Mikroskops. Durchschnittswerte aus n = 4 Versuchen mit Standardabweichung und Signifikanz *.

4.5 Modulation des intrazellulären F-Aktin-Gehalts

Intrazelluläres F-Aktin ist u. a. essentiell für die Zellmotilität und Reorganisation des Zytoskeletts (Lin et al. 2009, Yuan et al. 2008). Die Einzelapplikationen mit VPA resultierte nach 3 Tagen und deutlicher nach 5 Tagen Konzentrations-abhängig in einer signifikanten Erhöhung des F-Aktin-Gehalts in Caki-1 Zellen (Abb. 11). Die Kombinationen riefen überraschenderweise keine nennenswerte Veränderung gegenüber den Kontrollen hervor. Die Inkubation mit IFN-alpha allein hingegen induzierte eine signifikante Zunahme des F-Aktins.

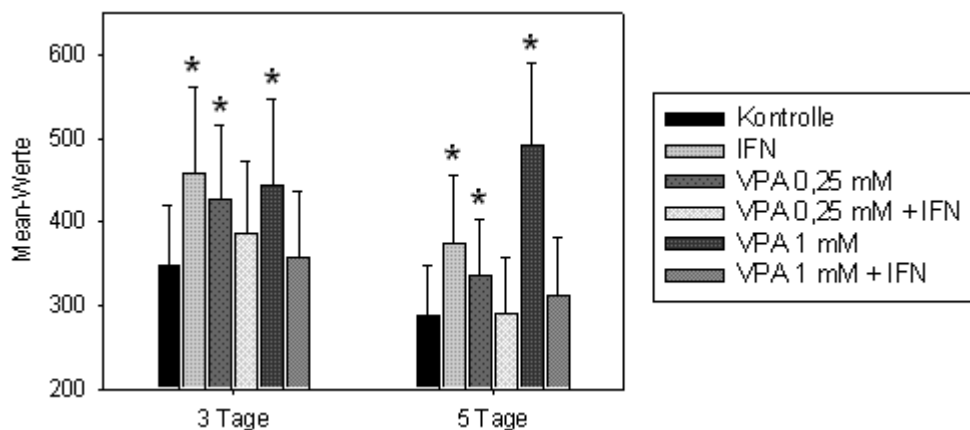


Abbildung 11: Intrazellulärer F-Aktin-Gehalt: Bestimmung mittels Durchflusszytometrie. Caki-1 nach 3- und 5-tägiger Vorbehandlung mit VPA und IFN-alpha. Phalloidin-FITC: Angaben in Mean-Werten. Signifikante Zunahme des F-Aktin-Anteils in den Zellen nach Einzelapplikation mit VPA und IFN-alpha. Die Effekte waren nach 5-tägiger Applikation verstärkt. Die Kombinationen zeigten keine signifikante Veränderung gegenüber den Kontrollen. Durchschnittswerte aus n = 3 Versuchen mit Standardabweichung und Signifikanz *.

4.6 Regulation des Zellzyklus mittels VPA und IFN-alpha

Die Proliferation der Tumorzellen wird über den Zellzyklus reguliert. Zur Aufklärung der Wirkmechanismen von VPA und IFN-alpha wurden daher die Zellzyklusphasen und die Expression von Zellzyklusproteinen in behandelten versus unbehandelten Tumorzellen untersucht.

4.6.1 Einfluss von VPA und IFN-alpha auf die Zellzyklusphasen

Unsynchronisierte Caki-1 Zellen befanden sich zu 84 % in der G0/G1-, zu 11 % in der S- und zu 5 % in der G2/M-Phase (Mittelwerte aus n=3 Versuchen, SD +/- 11-23 %, Daten nicht gezeigt). Die fluorimetrische Analyse der Zellzyklusphasen erfolgte daher an synchronisierten Caki-1 Zellen, um VPA- und IFN-alpha-bedingte Alterationen insbesondere auf die S- und G2/M-Phase eindeutiger detektieren zu können. Pilotstudien evaluierten einen maximalen Eintritt in die fortgeschrittene

S-Phase 4 Stunden nach dem Entfernen von Aphidicolin (Daten nicht gezeigt). Dieser Zeitpunkt entspricht Daten anderer Arbeitsgruppen (Plastaras et al. 2007, Sokolov et al. 2005). Konsequenterweise erfolgte die Zellzyklusanalyse 4 Stunden nach Beendigung der Inkubation mit Aphidicolin.

Zeit- und Konzentrations-abhängig induzierte VPA eine deutliche Zunahme des Anteils von Caki-1 Zellen in der G0/G1-Phase, die mit einer Reduktion von Tumorzellen in der S-Phase korrelierte (Abb. 12). Die 3-tägige Applikation erforderte dafür eine VPA-Konzentration von 1 mM (Abb. 12, links). Nach 5-tägiger Behandlung führte hingegen bereits die Einzelapplikation mit VPA 0,25 mM zu modulatorischen Effekten (Abb. 12, rechts). Die korrespondierenden Kombinationen mit IFN-alpha resultierten ebenfalls in einer deutlichen Zunahme des Anteils an Zellen in der G0/G1-Phase, wiederum begleitet von einer Abnahme des Anteils der Zellen in der S-Phase. Die Behandlung mit IFN-alpha allein zeigte hingegen keine Veränderungen der Zellzyklusphasen gegenüber den Kontrollen.

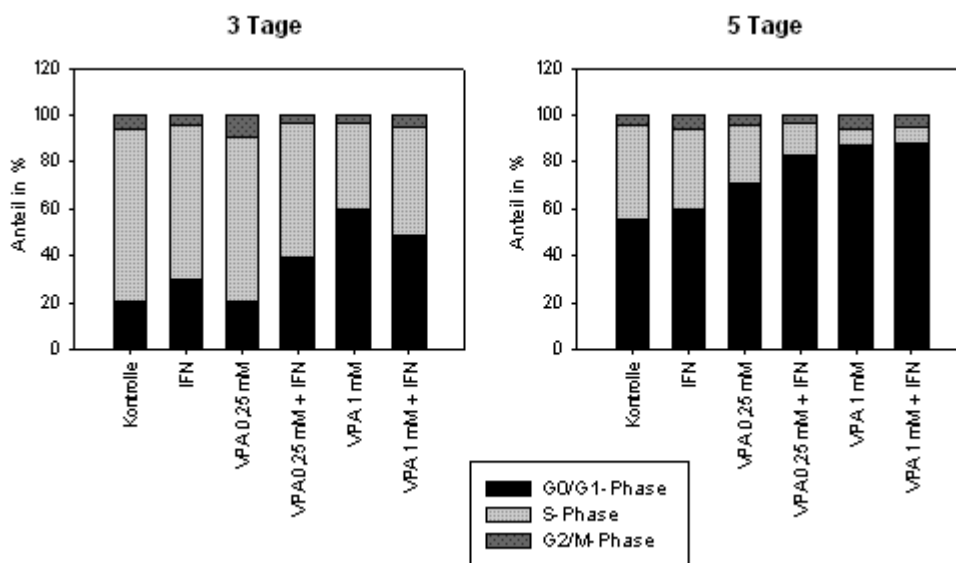


Abbildung 12: Zellzyklusphasen: Bestimmung mittels Durchflusszytometrie. Prozentualer Caki-1 Anteil nach 3 und 5 Tagen VPA- und/oder IFN-alpha-Applikation und 4 Stunden Inkubation nach Synchronisation an der G0/G1-, S- und G2/M-Phase. Nach 3-tägiger Applikation mit beiden Kombinationen und VPA 1 mM allein: Zunahme des Anteils der Zellen in der G0/G1-Phase und Verringerung der S-Phase. Nach 5-tägiger Behandlung: noch deutlichere Zunahme des Anteils an Zellen in der G0/G1-Phase und Abnahme der S-Phase nach Applikation mit VPA 0,25 mM und 1 mM sowie den korrespondierenden Kombinationsbehandlungen. Repräsentativ aus n = 4 Versuchen.

4.6.2 Einfluss von VPA und IFN-alpha auf die Expression von Zellzyklusproteinen

Zur detaillierten Analyse wurden mittels Western-Hybridisierung die Expression von Zellzyklusproteinen in synchronisierten Caki-1 Zellen untersucht. Die Expression der regulatorischen Proteine p27, Cyclin D3, Rb und Rb2 wurden durch VPA erhöht, unabhängig von der Behandlungsdauer (Abb. 13). Die Zellzyklusproteine Cyclin B und Cdk1 zeigten nach 5-tägiger VPA-Gabe ein verstärktes Expressionsverhalten. Nach 3-tägiger VPA-Applikation wurde hingegen der p21-Gehalt erhöht, nach 5-tägiger Anwendung jedoch nicht. Die Zellzyklusproteine Cdk2, Cdk4 und Cyclin A zeigten nach 3-tägiger VPA-Einzelgabe eine deutliche Reduktion. Diese war für Cdk2 und Cdk4 nach 5 Tagen etwas schwächer ausgeprägt. Cyclin A konnte nach 5-Tagen insgesamt nicht mehr detektiert werden.

Die korrespondierenden Kombinationen mit IFN-alpha, verabreicht über 5 Tage, resultierten in einer weiteren Expressionserhöhung von Rb, Rb2, Cdk1 und Cyclin B. Cyclin D3 wurde durch die Kombinationstherapie ebenfalls vermehrt exprimiert (Abb. 13, rechts). Gegenüber den entsprechenden VPA-Behandlungen war dieser Effekt jedoch nicht verstärkt. Die Kombination mit VPA 0,25 mM und IFN-alpha induzierte nach 3-tägiger Applikation ferner eine weitere Erhöhung der p21-Expression (Abb. 13, links). Die Kombination mit VPA 1 mM löste hingegen einen inversen Effekt aus. Die 5-tägige Behandlung mit der Kombination führte zu einer p21-Inhibition. Cdk2 und Cdk4 wurden nach VPA-Gabe und zusätzlicher Applikation von IFN-alpha weiter reduziert.

Die Einzelgabe von IFN-alpha konnte in der Regel keine Veränderungen des Proteingehalts gegenüber den Kontrollen bewirken. Eine Ausnahme bildeten lediglich Cdk1 und Cyclin A. Ihre Zunahme, insbesondere nach 3-tägiger Applikation, war ausschließlich auf IFN-alpha zurückzuführen (Abb. 13, links). Cdk1 zeigte zudem eine markante Erhöhung des Proteingehalts nach 5-tägiger IFN-alpha-Gabe (Abb. 13, rechts).

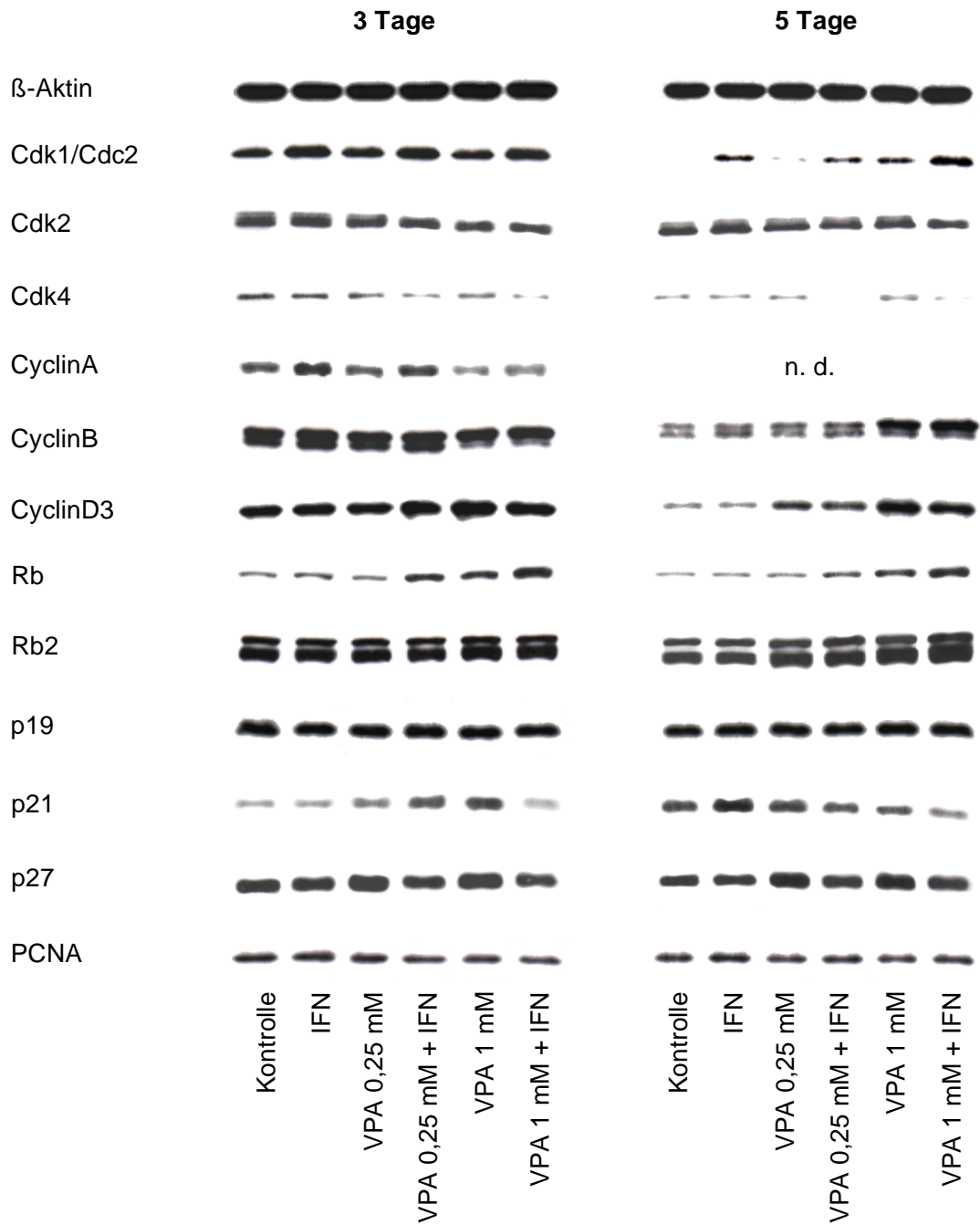


Abbildung 13: Zellzyklusproteine: Western Blot Analyse. Proteine aus synchronisierten Caki-1 Zellen nach 3 und 5 Tagen VPA- und/oder IFN-alpha-Applikation. Deutliche Modulation der regulatorischen Zellzyklusproteine Cdk1 / Cdc2, Cdk2, Cdk4, Cyclin A, Cyclin B, Cyclin D3, Rb, Rb2, p21 und p27 gegenüber den unbehandelten Kontrollen. Das Haushaltsprotein β-Aktin diente als Beladungskontrolle. Pro Probe wurden 50 µg Protein eingesetzt.

Die beobachteten, durch VPA-bedingten Alterationen der Zellzyklusproteine waren Konzentrations-abhängig (VPA 1 mM > 0,25 mM).

Die Zellzyklusproteine p19 und PCNA blieben durch die Behandlungen unbeeinflusst (Abb. 13).

4.7 Modulation der Expression Adhäsions-regulierender Proteine

4.7.1 Integrin-Oberflächenexpression

Integrine tragen entscheidend zur Steuerung von Adhäsionsprozessen bei. Der Einfluss von VPA und IFN-alpha auf Integrinprofil und -aktivität der Caki-1 Zellen wurde daher näher untersucht. Zunächst wurde die Rezeptor-Oberflächenexpression mittels Durchflusszytometrie evaluiert. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte in Form von Histogrammen (Abb. 14 & 15) mit dazugehöriger Datentabelle (Tab. 17). Der Übersichtlichkeit wegen wurden die Graphen der Behandlung mit IFN-alpha und VPA 0,25 mM nicht abgebildet.

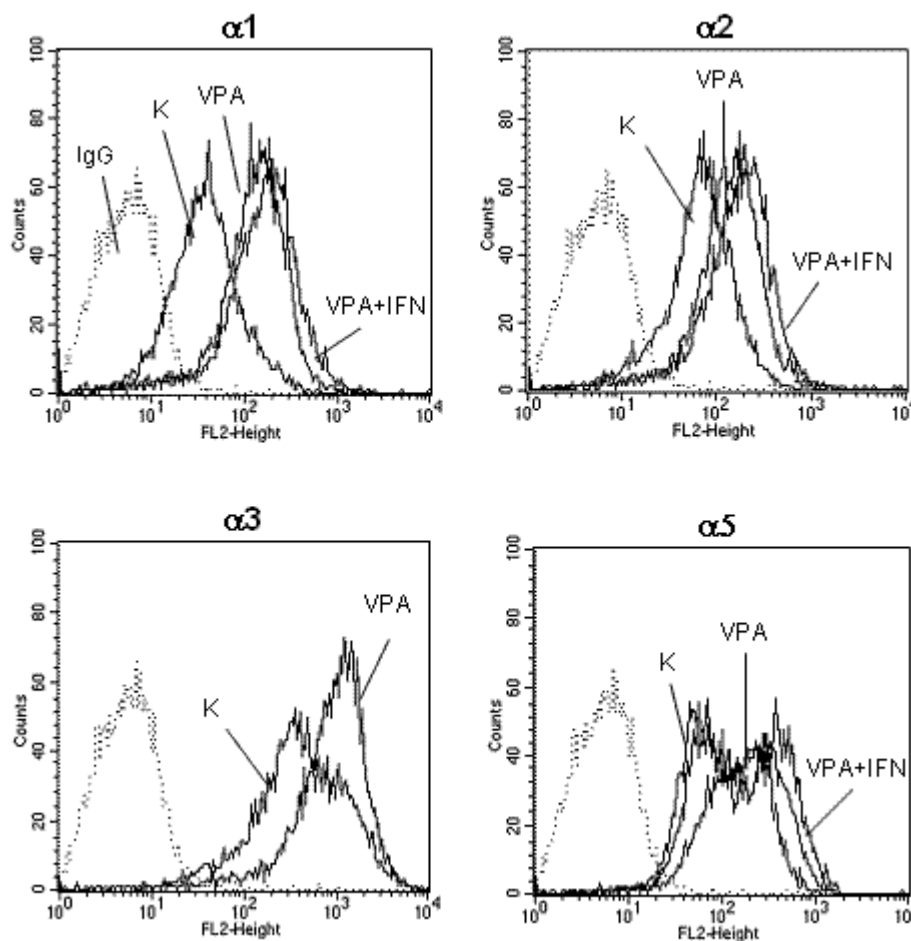


Abbildung 14: Oberflächenexpression der alpha-Integrine: Durchflusszytometrie. Caki-1 Zellen nach 5 Tagen Vorbehandlung mit VPA und/oder IFN-alpha. Abszisse: relative logarithmische Verteilung der Fluoreszenzintensität. Ordinate: relative Zellzahl. Konzentrationsabhängige Zunahme der relativen Fluoreszenzintensität von $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$ und $\alpha 5$ nach VPA-Applikation. Verstärkung bei $\alpha 1$, $\alpha 2$ und $\alpha 5$ durch Kombination mit IFN-alpha. Hintergrundkontrolle: IgG1-PE und IgG2a-PE. Repräsentativ aus $n = 3$ Versuchen. Gezählt wurden jeweils 10.000 Zellen.

Die Integrinsubtypen $\alpha 3$, $\beta 1$ und $\beta 3$ zeigten in den unbehandelten Caki-1 Zellen eine starke Oberflächenpräsenz. Integrin $\alpha 4$ und $\alpha 6$ waren gegenüber der Hintergrundfluoreszenz hingegen kaum erhöht (Daten nicht gezeigt). Konzentrations-abhängig war eine Zunahme der relativen Fluoreszenzintensität nach VPA-Gabe bei Integrin $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\beta 3$ und $\beta 4$ gegenüber den Kontrollen zu beobachten. Die gesteigerte Oberflächenexpression war nach Applikation mit VPA 1 mM bei den Subtypen $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 1$ und $\beta 3$ signifikant erhöht (Abb. 14 & 15). Gleiche Effekte konnten auch nach 3-tägiger Behandlung nachgewiesen werden (Daten nicht gezeigt).

Die Kombination mit IFN-alpha bewirkte bei den Integrinen $\alpha 1$, $\alpha 2$ und $\alpha 5$ eine weitere Zunahme der relativen Fluoreszenz (Abb. 14). Bei $\alpha 3$ und den β -Ketten führte die Kombination gegenüber der VPA-Einzelapplikation zu keiner weiteren Verstärkung der relativen Fluoreszenzintensität (Abb. 14 & 15). Die IFN-alpha-Gabe induzierte z. T. moderate, jedoch keine signifikante Veränderung der Oberflächenexpression gegenüber den Kontrollen. Integrin $\alpha 4$ und $\alpha 6$ zeigten nach den Behandlungen keine Alteration in ihrer Oberflächenexpression gegenüber den Kontrollen (Daten nicht gezeigt).

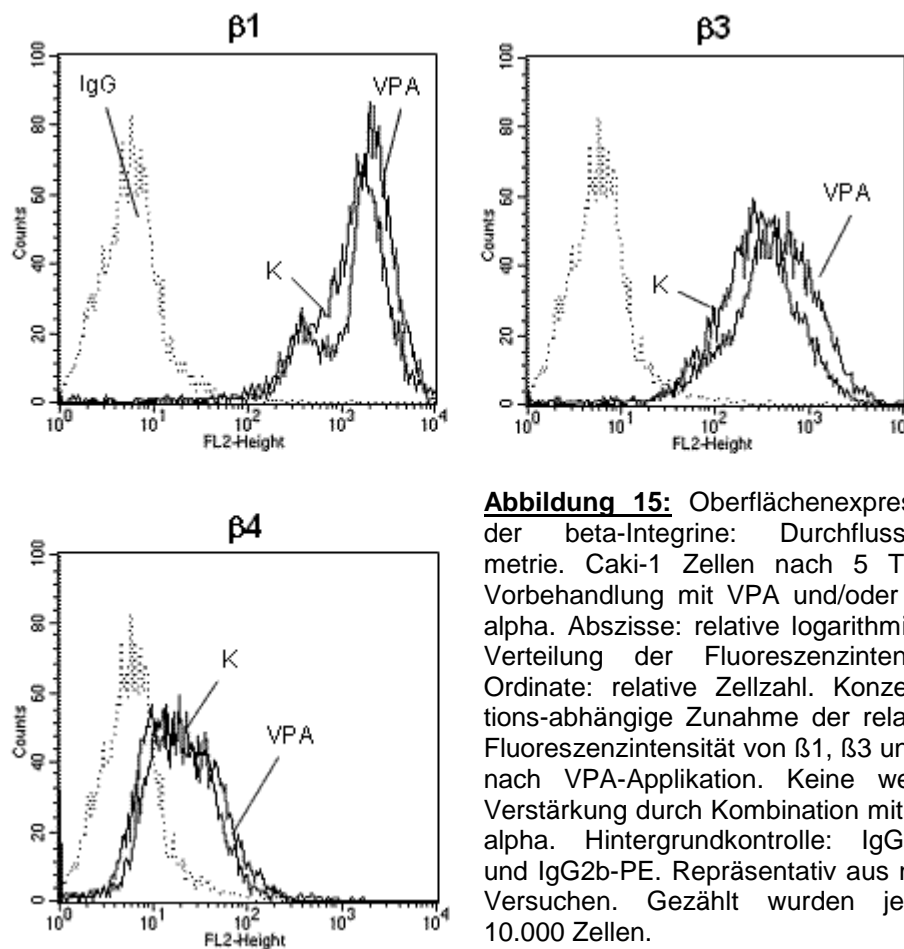


Abbildung 15: Oberflächenexpression der beta-Integrine: Durchflusszytometrie. Caki-1 Zellen nach 5 Tagen Vorbehandlung mit VPA und/oder IFN-alpha. Abszisse: relative logarithmische Verteilung der Fluoreszenzintensität. Ordinate: relative Zellzahl. Konzentrations-abhängige Zunahme der relativen Fluoreszenzintensität von $\beta 1$, $\beta 3$ und $\beta 4$ nach VPA-Applikation. Keine weitere Verstärkung durch Kombination mit IFN-alpha. Hintergrundkontrolle: IgG1-PE und IgG2b-PE. Repräsentativ aus $n = 3$ Versuchen. Gezählt wurden jeweils 10.000 Zellen.

A Integrinsubtypen nach 5-tägiger Behandlung, Angaben in Mean-Werten

	$\alpha 1$	$\alpha 2$	$\alpha 3$	$\alpha 5$	$\beta 1$	$\beta 3$	$\beta 4$
Kontrolle	49,92	80,40	642,79	138,99	1.520,13	375,47	22,41
IFN 200 U / ml	64,35	99,03	740,82	175,85	1.660,42	406,92	22,68
VPA 1 mM	156,06	159,69	921,72	200,54	2.022,42	594,73	29,11
VPA 1 mM + IFN	204,94	199,05	1.091,72	288,17	1.930,38	550,91	29,73

B Isotypenkontrollen, Angaben in Mean-Werten

IgG1	IgG2a	IgG2b
7,98	10,09	9,56

Tabelle 17: Durchflusszytometrie: **A** Datentabelle der Oberflächenexpression der alpha- und beta-Integrine von Caki-1 Zellen. Die Zellen wurden 5 Tage mit VPA und/oder IFN-alpha vorbehandelt. Alle Angaben sind Mean-Werte. Konzentrations-abhängige Zunahme der relativen Fluoreszenzintensität von $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, $\beta 1$, $\beta 3$ und $\beta 4$ nach VPA (1 mM)-Applikation. Bei $\alpha 1$, $\alpha 2$ und $\alpha 5$ weitere Verstärkung des Effekts durch Kombination mit IFN-alpha. IFN-alpha induzierte keine oder lediglich moderate Alterationen. **B** Isotypenkontrolle: IgG1-PE, IgG2a-PE und IgG2b-PE. Repräsentativ aus n = 3 Versuchen. Gezählt wurden jeweils 10.000 Zellen.

4.7.2 Intrazelluläre Integrinexpression

Mittels Western Blot Analyse wurde die intrazelluläre Proteinexpression der Integrinsubtypen evaluiert. Der Proteingehalt des Integrin $\alpha 1$ nahm nach VPA-Behandlung unabhängig von der Konzentration deutlich zu (Abb. 16). Die Subtypen $\alpha 2$ und $\alpha 5$ wurden erst nach 5-tägiger Applikation mit VPA Konzentrations-abhängig erhöht. Die Integrine $\alpha 3$, $\beta 1$, $\beta 3$ und $\beta 4$ hingegen wurden in Gegenwart von VPA im Proteingehalt vermindert. Integrin $\beta 3$ wurde überraschenderweise stärker durch VPA 0,25 mM als durch VPA 1 mM reduziert. Konzentrations-unabhängig induzierte die 5-tägige VPA-Behandlung des Weiteren eine deutliche Reduktion des $\beta 4$ -Proteingehalts.

In der Kombination mit IFN-alpha wurde die intrazelluläre Expression der Subtypen $\alpha 1$, $\alpha 2$ und $\alpha 5$ gegenüber den Kontrollen erhöht. Für $\alpha 1$ und $\alpha 5$ war diese Zunahme nach 5 Tagen verglichen mit den Monotherapien weiter erhöht. Die Integrine $\beta 3$ und $\beta 4$ wurden nach 5-tägiger Behandlung mit der Kombination deutlich reduziert, jedoch waren diese Effekte gegenüber der VPA-Einzelapplikation nicht weiter verstärkt. Die Expression von $\alpha 3$ ist kontrovers zu bewerten. So induzierte die 3-tägige additive Applikation mit IFN-alpha eine Verminderung, ähnlich der VPA-Gabe. Die 5-tägige Kombinationsbehandlung hingegen resultierte in keiner Veränderung gegenüber der Kontrolle. Auch der $\beta 1$ -Gehalt zeigte nach Gabe von VPA und IFN-alpha keine Alterationen.

Die Einzelapplikation mit IFN-alpha konnte keine Veränderung hervorrufen, ausgenommen Integrin $\alpha 5$. Der Subtyp $\alpha 5$ wurde durch IFN-alpha allein bereits stark erhöht.

Die Integrine $\alpha 4$ und $\alpha 6$ waren kaum detektierbar und wurden durch die Behandlung mit den genannten Substanzen quantitativ nicht modifiziert (Daten nicht gezeigt).

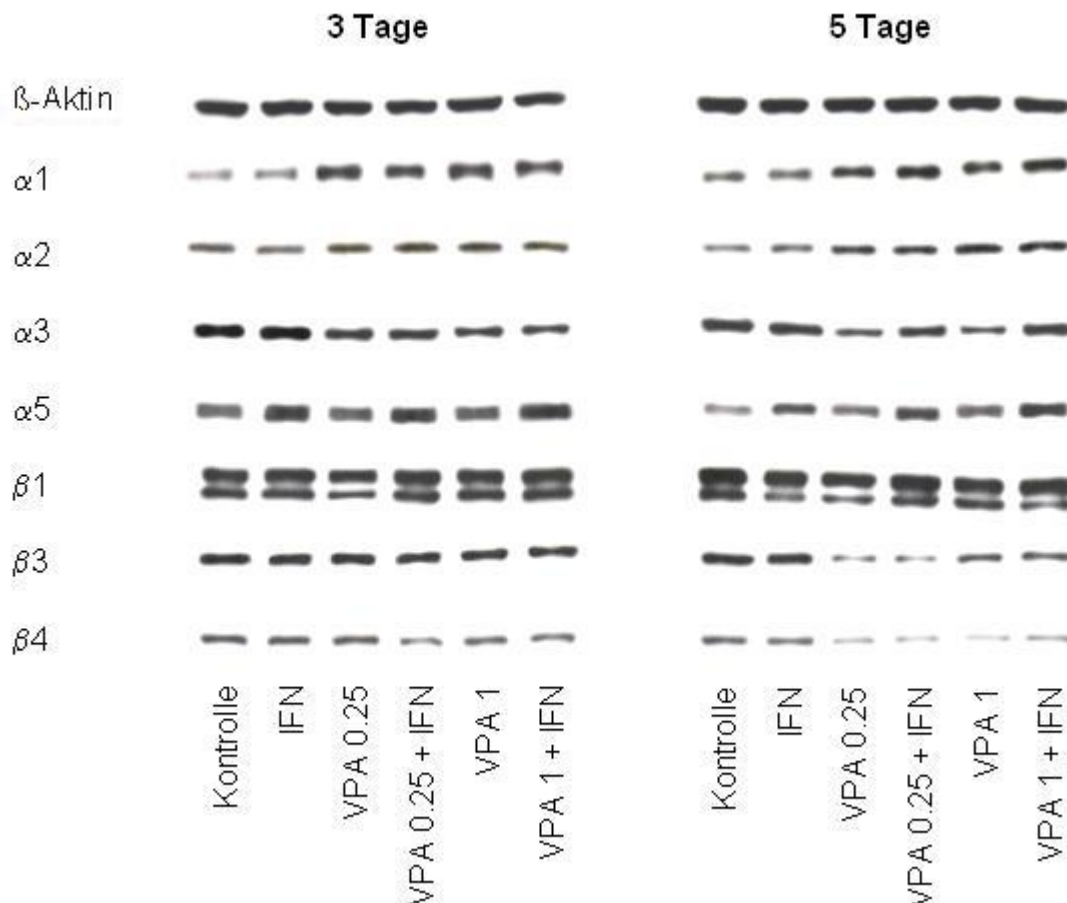


Abbildung 16: Proteinexpression der alpha- und beta-Integrine: Western Blot Analyse. In Caki-1 Zellen nach 3 und 5 Tagen VPA- und/oder IFN-alpha-Applikation gegenüber den unbehandelten Kontrollzellen. Modulation der Integrinexpression durch VPA- und/oder IFN-alpha-Gabe. β -Aktin diente als Beladungskontrolle. Pro Probe wurden 50 μ g Protein eingesetzt.

4.7.3 Expression relevanter Signalproteine

Quantitative Veränderungen der Integrine müssen nicht notwendigerweise mit einer veränderten Integrinaktivität gekoppelt sein. Um Rückschlüsse auf den Aktivitätszustand ziehen zu können, wurden relevante Signalproteine, implizit ILK (*Integrin-linked kinase*), FAK (*Focal adhesion kinase*) und phosphoryliertes bzw. aktiviertes pFAK untersucht. Die FAK-Aktivität (pFAK) nahm nach 5-tägiger Einzelapplikation von VPA deutlich ab (Abb. 17). Die korrespondierenden Kombinationen mit IFN-

alpha resultierten bereits nach 3 Tagen in einer starken Reduktion von pFAK, die nach 5-tägiger Behandlung weiter zunahm. Die Expression von ILK und FAK wurde ausschließlich durch die Kombination von VPA und IFN-alpha inhibiert (FAK > ILK, Abb. 17). Die Einzelapplikation mit IFN-alpha induzierte keine Veränderungen.

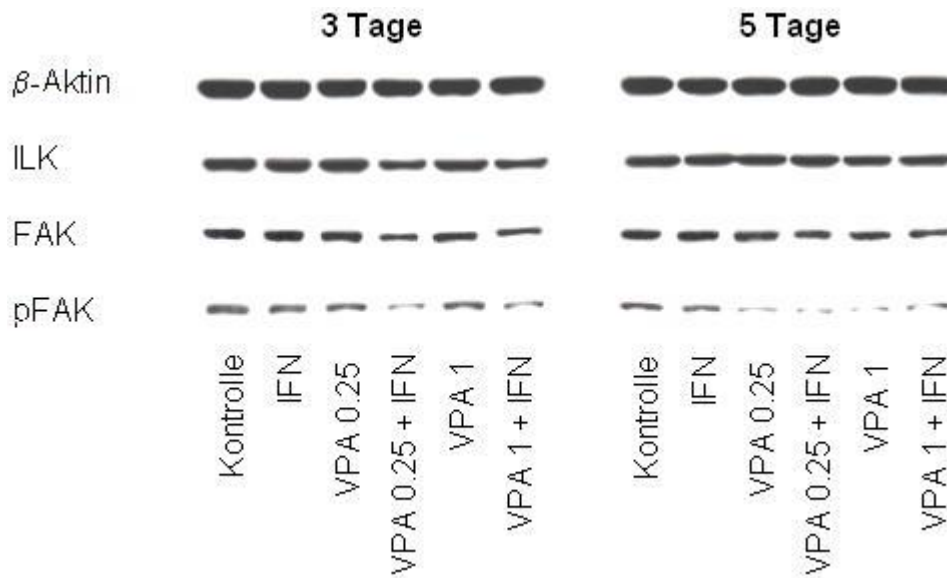


Abbildung 17: Integrinaktivität: Western Blot Analyse. Proteine aus Caki-1 Zellen nach 3 und 5 Tagen VPA- und/oder IFN-alpha-Applikation. ILK = Integrin-*linked* Kinase, FAK = *Focal Adhesion* Kinase, pFAK = phosphoryliertes FAK. Expressionshemmung vor allem nach den Kombinations-Behandlungen. Verstärkung der Effekte nach 5-tägiger Applikation bei pFAK. Nachlassen der Effekte nach 3 Tagen Behandlung bei ILK und FAK. β -Aktin diente als Kontrolle. Pro Probe wurden 50 μ g Protein eingesetzt.

4.7.4 CD44-Oberflächenexpression

CD44-Rezeptoren sind neben der Proliferation auch in die Adhäsion involviert. Die CD44-*Splicevarianten* V3 bis V7, V7/8, V10 und der CD44-Standard wurden mittels Durchflusszytometrie an der Zelloberfläche der Caki-1 Zellen untersucht. Die Darstellung der Ergebnisse erfolgte in Form von Datentabellen (Tab. 18), repräsentativ für die 5-tägige Behandlungsdauer zusätzlich in Histogrammen (Abb. 18). Der Übersichtlichkeit wegen wurden in den Histogrammen lediglich die Graphen der Isotypenkontrolle, der unbehandelten und der mit der VPA 1 mM/IFN-alpha-Kombination behandelten Zellen dargestellt.

Die Einzelapplikation mit VPA 1 mM induzierte eine signifikante Zunahme der relativen Fluoreszenz der CD44-Varianten und des CD44-Standard. Nach 5-tägiger Behandlung war dieser Effekt stärker ausgeprägt als nach 3 Tagen. VPA 0,25 mM allein resultierte hingegen zu keinem Zeitpunkt in einer Alteration der CD44-Oberflächenexpression gegenüber den Kontrollen. Die additive Applikation von IFN-

alpha induzierte eine weitere Intensivierung der relativen Fluoreszenz gegenüber der Monobehandlung mit VPA 1 mM. Auch VPA 0,25 mM rief in der Kombination mit IFN-alpha eine deutliche Verstärkung der relativen Fluoreszenz der CD44-Varianten hervor, ausgenommen des CD44-Standards nach 5 Tagen. Gegenüber der Einzelapplikation mit IFN-alpha war diese jedoch nur in den Kombinationen mit VPA 1 mM weiter erhöht. So nach 3-tägiger Behandlung bei den CD44-Varianten V3, V4, V7/8 und den CD44-Standard, nach 5 Tagen bei allen CD44-Varianten. IFN-alpha allein induzierte dabei bereits eine signifikante Stimulation der CD44-Varianten, nicht jedoch des CD44-Standards.

A 3 Tage Inkubation, Angaben in Mean-Werten

	CD44 V3	CD44 V4	CD44 V5	CD44 V6	CD44 V7	CD44 V7/8	CD44 V10	CD44 SD
Kontrolle	20,80	11,03	13,80	27,24	12,30	20,06	11,24	86,56
IFN 200 U / ml	34,12	17,46	19,80	47,10	28,08	28,69	23,79	85,66
VPA 0,25 mM	21,02	9,08	10,38	23,48	11,45	14,73	10,63	82,08
VPA 0,25 mM + IFN	33,58	18,41	19,01	42,98	24,54	27,29	19,21	108,08
VPA 1 mM	34,03	15,69	16,68	38,11	16,16	23,26	16,66	115,90
VPA 1 mM + IFN	38,56	20,96	18,53	45,93	22,62	30,86	19,74	130,59

B 5 Tage Inkubation, Angaben in Mean-Werten

5 Tage Inkubation	CD44 V3	CD44 V4	CD44 V5	CD44 V6	CD44 V7	CD44 V7/8	CD44 V10	CD44 SD
Kontrolle	18,48	11,75	21,27	8,15	23,52	11,84	7,58	90,10
IFN 200 U / ml	26,51	18,29	34,30	15,18	30,68	21,61	13,77	97,63
VPA 0,25 mM	19,94	11,16	21,70	8,71	18,00	12,25	8,74	97,80
VPA 0,25 mM + IFN	25,99	13,30	27,69	11,83	22,62	17,22	12,07	92,63
VPA 1 mM	30,75	24,21	39,23	17,58	33,34	22,86	16,72	113,52
VPA 1 mM + IFN	48,08	34,64	53,82	26,20	37,70	32,63	23,89	129,97

C Ig-FITC Kontrollen für 3 bzw. 5 Tage Inkubation, Angaben in Mean-Werten

	3 Tage	5 Tage
Ig-FITC	4,98	4,15

Tabelle 18: Durchflusszytometrie: Datentabellen der Oberflächenexpression der CD44-Rezeptoren. Mean-Werten der CD44-*Splicevarianten* V3, V4, V5, V6, V7, V7/8 und V10 sowie dem CD44 Standard (SD) von Caki-1 Zellen. Die Zellen wurden zuvor 3 Tage **A** und 5 Tage **B** mit VPA und/oder IFN-alpha behandelt. **C** Mean-Werte der Ig-FITC Kontrollen von 3 und 5 Tagen Inkubation. Intensivierung der relativen Fluoreszenz nach Applikation von VPA 1 mM und IFN-alpha allein. Verstärkung der Effekte durch die korrespondierende Kombinationsbehandlung. Repräsentativ aus n = 6 Versuchen. Gezählt wurden jeweils 10.000 Zellen.

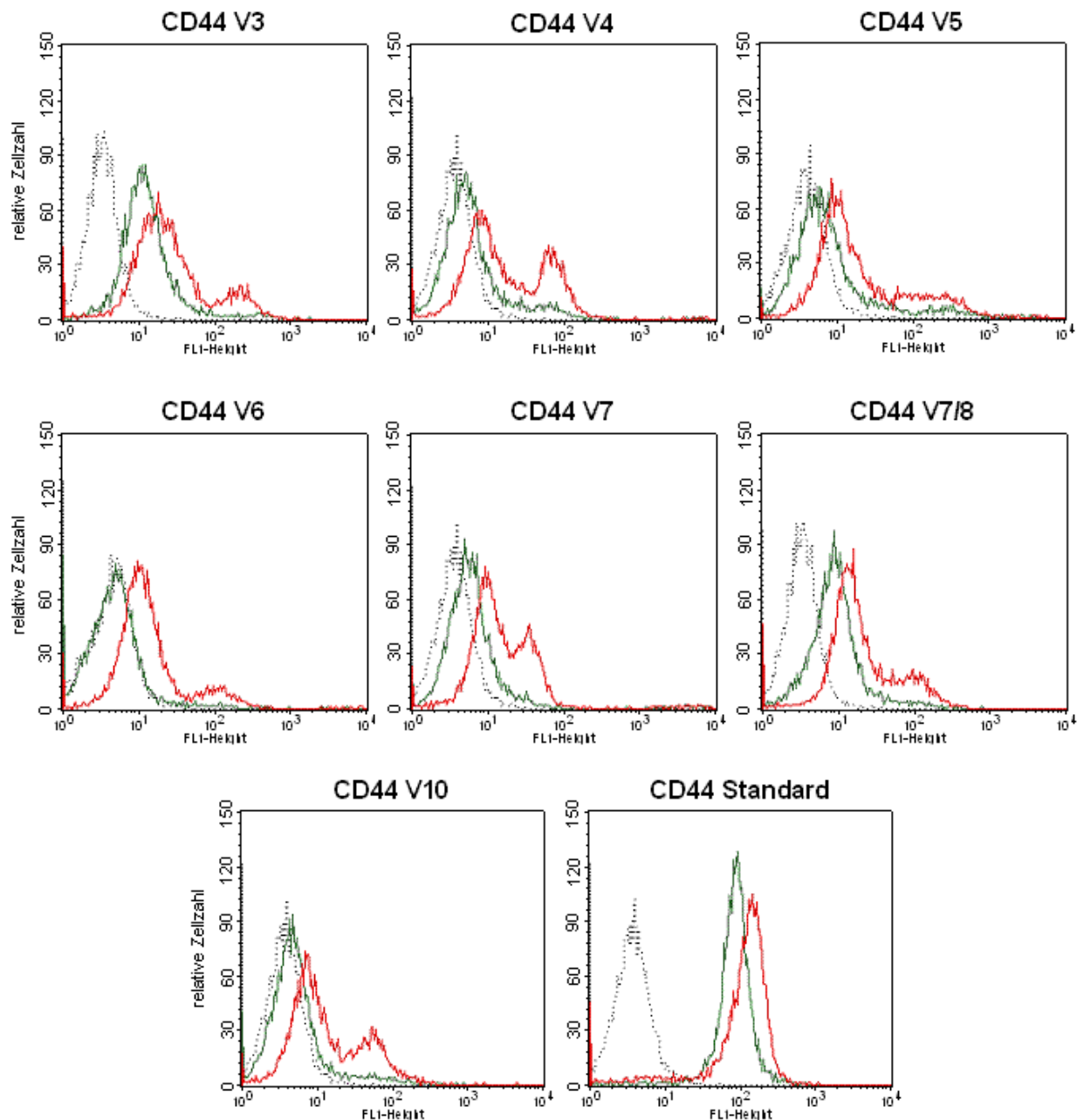


Abbildung 18: Oberflächenexpression der CD44-Rezeptoren: Durchflusszytometrie. Histogramme der CD44-Splicevarianten V3, V4, V5, V6, V7, V7/8 und V10 sowie dem CD44-Standard von Caki-1 Zellen. Nach 5-tägiger Applikation mit VPA und/oder IFN-alpha. Abszisse: relative logarithmische Verteilung der Fluoreszenzintensität. Ordinate: relative Zellzahl. Gestrichelter Graph = Isotypenkontrolle Ig-FITC, grüner Graph = unbehandelte Kontrollzellen, roter Graph = VPA 1 mM + IFN-alpha 200 U/ml. Intensivierung der relativen Fluoreszenz nach kombinierter Gabe von VPA 1 mM und IFN-alpha. Repräsentativ aus n = 6 Versuchen. Gezählt wurden jeweils 10.000 Zellen.

4.8 Modulation intrazellulärer Signalwege

Mittels Western Blot Analysen wurden Modulationen intrazellulärer Signalwege nach VPA- und/oder IFN-alpha-Behandlung evaluiert. β -Aktin diente als Kontrolle für die gleichmäßige Beladung der SDS-Gele mit Protein. Die Expression des Tumorsuppressors p73 wurde durch die 3-tägige Applikation mit VPA erhöht (Abb. 19,

links). Nach 5-tägiger Applikation waren die Effekte lediglich moderat. Die Expression des c-myc, JNK, aktivierten Erk1/2 (pErk1/2), Akt (quantitativ & aktiviert) und PPAR γ wurden Konzentrations-abhängig nach VPA-Behandlung inhibiert. In der Regel resultierte die 5-tägige Behandlung in stärkeren Effekten (Abb. 19, rechts). Insbesondere die 5-tägige Behandlung mit VPA 1 mM und IFN-alpha verstärkte die p73-Expression weiter und induzierte eine Reduktion von c-myc, JNK, pErk1/2, Akt, pAkt und PPAR γ . Die Einzelapplikation mit IFN-alpha zeigte dabei bereits moderate Wirkung auf p73 (3 Tage), JNK (3 Tage) und pErk1/2 (5 Tage).

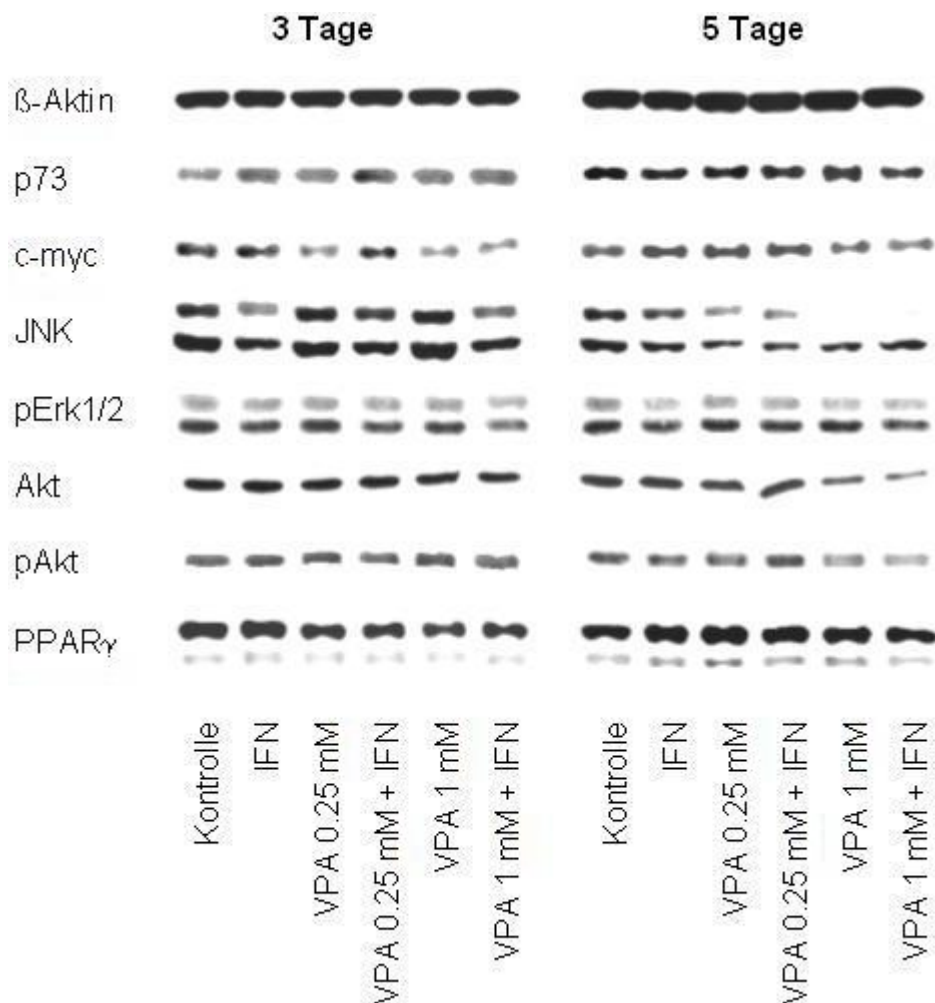


Abbildung 19: Tumorsuppressoren und Protoonkogene: Western Blot Analyse. Proteingehalt in Caki-1 Zellen nach 3 und 5 Tagen VPA- und/oder IFN-alpha-Applikation. p73 = p53-Homolog, c-myc, JNK = Jun Kinase (untere Bande), pErk1/2 = phosphorylierte extrazelluläre Signal-regulierende Kinase 1 und 2, Akt (quantitativ und aktiviert) und PPAR γ = Peroxisomen proliferativ aktiver Rezeptor gamma. Erhöhung des Tumorsuppressors p73 sowie Inhibition der Protoonkogene und deren Aktivität hauptsächlich nach 5-tägiger VPA- und/oder IFN-alpha-Behandlung. β -Aktin diene als Kontrolle. Pro Probe wurden 50 μ g Protein eingesetzt.

Die genannten Effekte wurden sowohl in EGF-stimulierten als auch unstimulierten Caki-1 Zellen gemessen.

Die Expression weiterer regulatorischer Proteine, wie der MAPK p38 und ihrer phosphorylierten Form pp38, Erk1, Erk2 und des phosphorylierten JNK wurden evaluiert. Sie zeigten jedoch keine Veränderungen nach der Behandlung gegenüber den Kontrollen (Daten nicht gezeigt). Gleiches galt für die Tumorsuppressoren p53, PTEN sowie das phosphorylierte PTEN (pPTEN).

4.9 Inhibition der HDAC-Aktivität - Histonhyperacetylierung

VPA zählt zur Gruppe der HDAC-Inhibitoren. Nachfolgend wurde daher seine Wirkung auf die HDAC-Aktivität in Caki-1 Zellen analysiert. Die Evaluierung erfolgte mittels HDAC-Aktivitätsnachweis und Western Blot Analyse.

Die Einzelgabe von VPA resultierte Konzentrations-abhängig in einer signifikanten Inhibition der HDAC-Aktivität, repräsentiert durch die verringerte Menge gebildeten deacetylierten Substrats (Abb. 20). Die Kombination mit IFN-alpha führte zu einer weiteren, synergistischen Reduktion. Die Behandlung mit IFN-alpha allein induzierte dabei keine Modifizierung der HDAC-Aktivität.

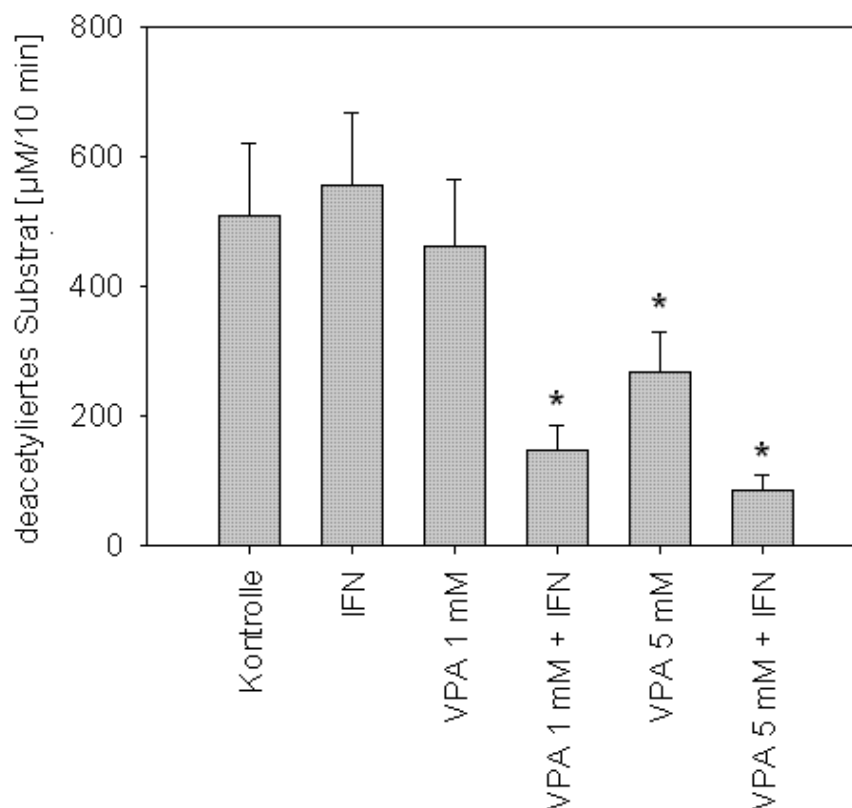


Abbildung 20: HDAC-Aktivität: Konzentration des deacetylierten Substrats in μM nach 10-minütiger Inkubation (y-Achse). Durchflusszytometrie. Caki-1 nach 12 Stunden Vorbehandlung mit VPA 1mM bzw. VPA 5 mM und/oder IFN-alpha 200 U/ml. Signifikante Inhibition der HDAC-Aktivität nach VPA 5 mM Applikation und den Kombinationsbehandlungen. Durchschnittswerte aus $n = 5$ Versuchen mit Standardabweichung und Signifikanz *.

Western Blot Analysen zeigten nach 12-stündiger VPA-Applikation eine deutliche Konzentrations-abhängig Verringerung der HDAC3-Expression (Abb. 21, links) sowie eine moderate Hemmung der HDAC4-Expression. Diese korrelierte mit einer Hyperacetylierung der Histone H3 und H4. Die Effekte wurden durch die jeweilige Kombination mit IFN-alpha verstärkt. Nach 24 Stunden nahm die Wirkung auf HDAC3 und HDAC4 ab (Abb. 21, rechts). Der Anteil an acetyliertem Histon H3 und H4 war hingegen in Gegenwart von VPA und IFN-alpha noch deutlich detektierbar. Die Kombination mit IFN-alpha führte zu einer weiteren Verstärkung der beobachteten Effekte. IFN-alpha allein rief zu allen Zeitpunkten keine oder nur sehr moderate Wirkung hervor.

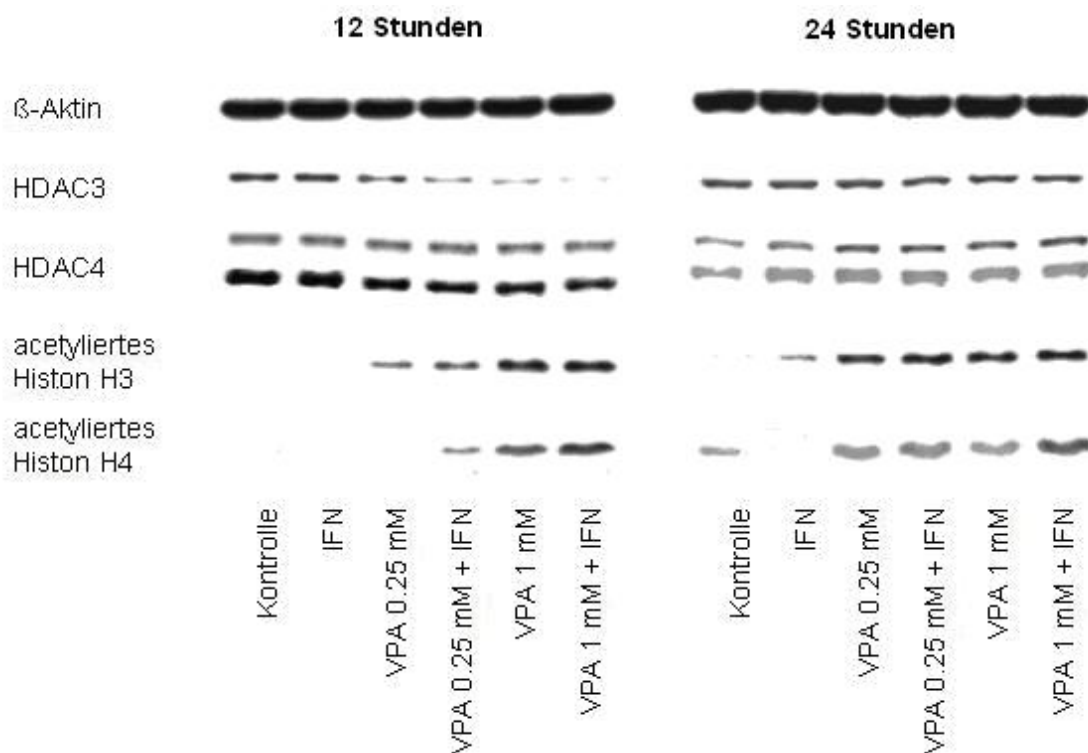


Abbildung 21: Proteinexpression der HDACs und Histone (quantitativ und acetyliert). Western Blot Analyse. Aus Caki-1, 12 und 24 Stunden nach VPA- und/oder IFN-alpha-Applikation. Nach 12 Stunden deutlich verringerte Expression von HDAD3 und Zunahme des acetylierten Histon H3 und H4 sowie moderate Hemmung der HDAC4 Expression. Nach 24-stündiger Behandlung kein sichtbarer Einfluss auf HDAC3 und HDAC4 mehr. Der Anteil an acetyliertem Histon H3 und H4 nahm jedoch noch nach VPA-Mono- und Kombinations-therapie deutlich zu. β -Aktin diente als Kontrolle. Pro Probe wurden 50 μ g Protein eingesetzt.

4.10 Modulation der Genexpression durch VPA und IFN-alpha

4.10.1 *Microarray*-Analysen

Mittels *Microarray*-Analysen wurden Genexpressionsprofile der behandelten und unbehandelten Caki-1 Zellen erstellt und miteinander verglichen. Je Probe wurden drei unabhängige Ansätze durchgeführt (A, B und C).

4.10.1.1 *unsupervised* Analyse

Aus den Daten der Expressionsprofile wurden in der *unsupervised* Analyse Übereinstimmungen der Expression von Transkripten innerhalb der unterschiedlichen Proben detektiert. Zwischen den Proben der drei unabhängigen Sets (A, B und C) bestand eine gute Korrelation. (siehe Anhang, Abb. 28).

4.10.1.2 *supervised* Analyse

Um ein Behandlungs-spezifisches Genprofil erstellen zu können, wurden die Expressionsprofile der 12 Stunden, 3 sowie 5 Tage behandelten Caki-1 Zellen mit den unbehandelten Kontrollen abgeglichen. Mittels *Venn Diagram Generator* konnte die Anzahl der Gene aus behandelten Caki-1 Zellen, deren Expression gegenüber den unbehandelten Kontrollen zu den unterschiedlichen Behandlungszeitpunkten (12 Stunden, 3 und 5 Tage) modifiziert wurden, evaluiert werden.

In Abbildung 22 ist die Anzahl der gemittelten Gentranskripte, die nach den einzelnen Behandlungen Veränderungen gegenüber den Kontrollen aufwiesen, graphisch dargestellt (Abb. 22). Die Diagramme zeigen sowohl Zeit-abhängig Alterationen der Genexpression als auch Überschneidungen von veränderten Genen zu unterschiedlichen Zeitpunkten.

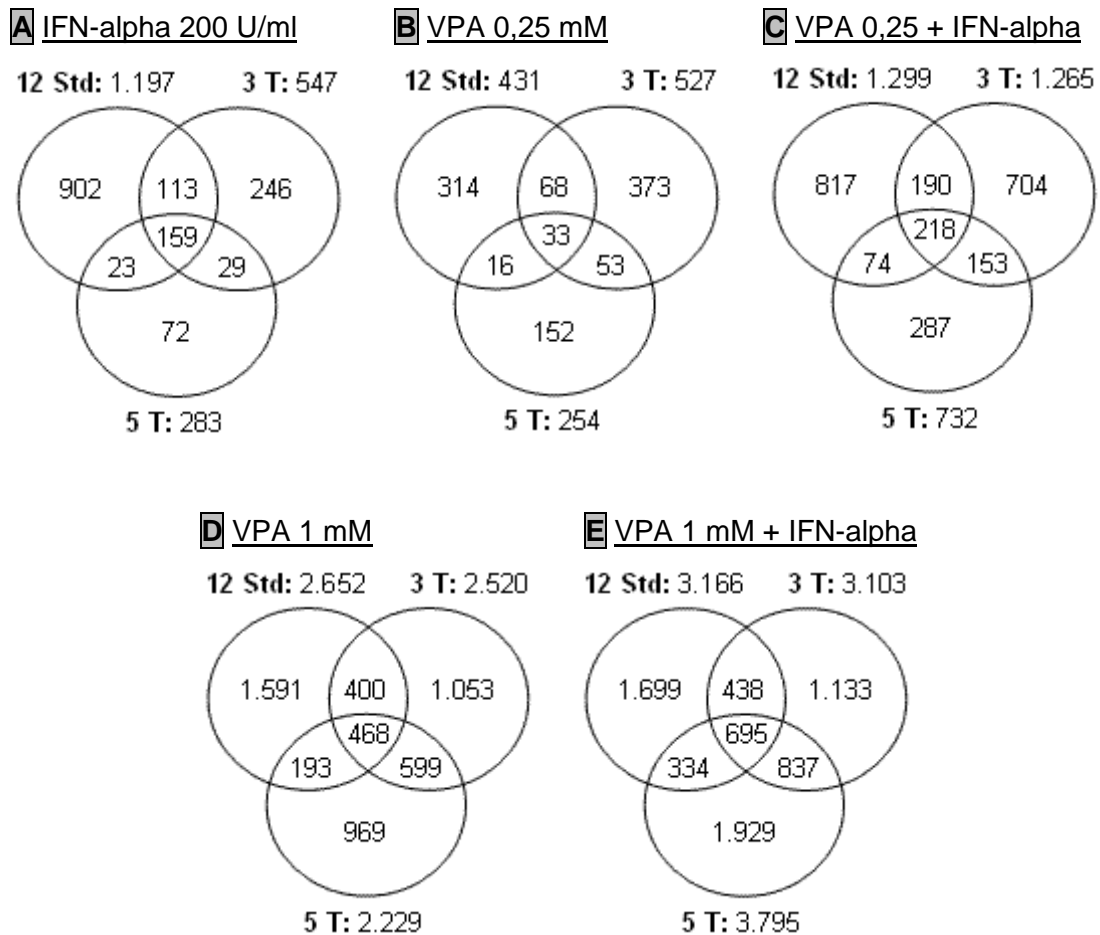


Abbildung 22: Zeit-abhängige Veränderungen des Genprofils: *Microarray*-Analyse. Venn Diagramme der Genexpressionsmodulation von Caki-1 Zellen bei Applikation von: **A** IFN-alpha 200 U/ml, **B** VPA 0,25 mM, **C** VPA 0,25 mM + IFN-alpha, **D** VPA 1 mM und **E** VPA 1 mM + IFN-alpha nach 12 Stunden (12 Std), 3 Tagen (3 T) und 5 Tagen (5 T) Behandlung. Korrelationen zwischen den modifizierten Genen zu den unterschiedlichen Zeitpunkten nach gleicher Behandlung (Schnittmengen). Aus n = 3 Versuchsansätzen.

In Abbildung 23 wurden hingegen Alterationen der Genexpression innerhalb des gleichen Zeitpunktes aber unterschiedlicher Behandlung miteinander verglichen (Abb. 23). Die Venn Diagramme evaluierten, dass nur ein Teil der durch Einzelbehandlung induzierten alterierten Genexpressionen das veränderte Expressionsprofil der Kombinationen ausmacht. Neben Genen, die sowohl nach Mono- als auch Kombinationsbehandlung verändert exprimiert wurden, gab es somit Gene, die allein durch die Einzelapplikationen oder die Kombination modifiziert wurden.

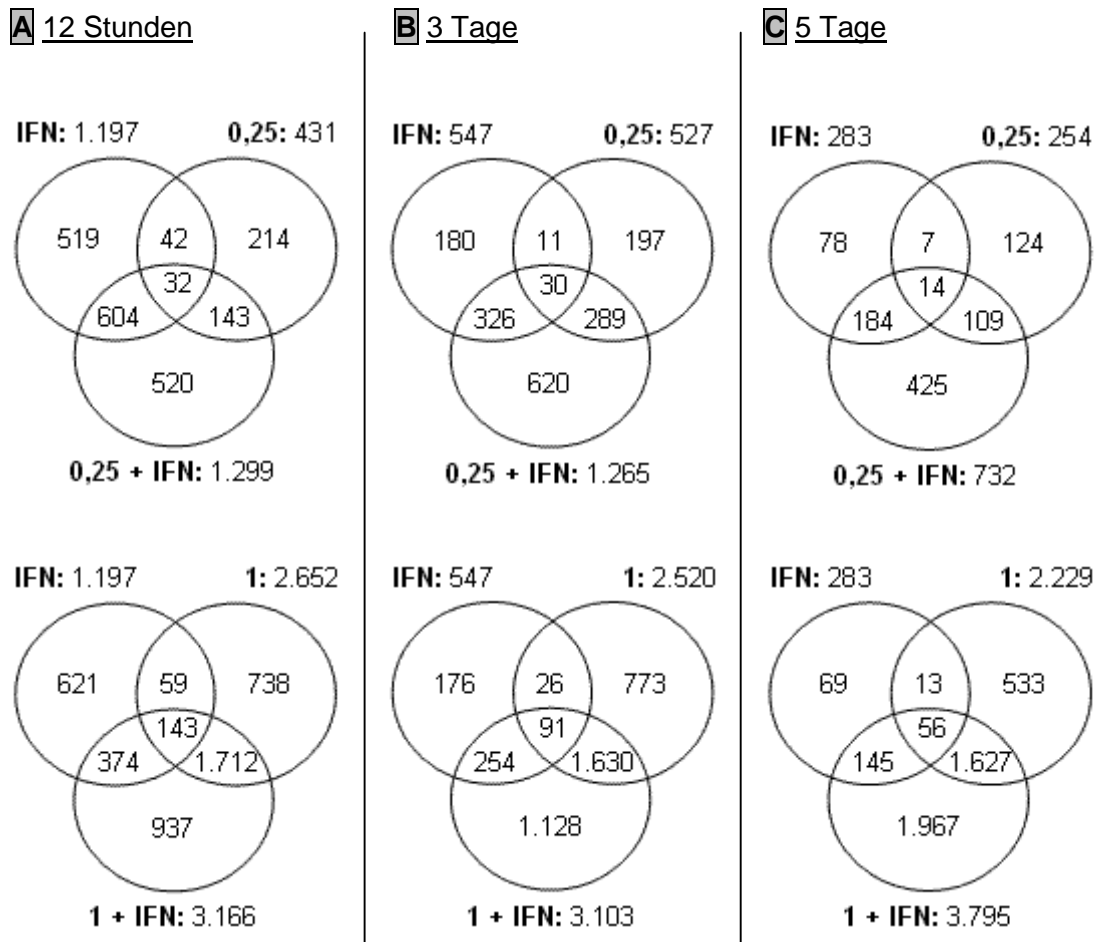


Abbildung 23: Therapie-abhängige Modulationen des Genprofils: *Microarray*-Analyse. Venn Diagramme der modifizierten Gene aus Caki-1 Zellen nach **A** 12 Stunden, **B** 3 Tagen und **C** 5 Tagen Behandlung mit IFN-alpha (IFN), VPA 0,25 mM (0,25) und VPA 1 mM (1). Die Kombinationsbehandlung resultiert nicht ausschließlich in additiven Alterationen von Gene der Monotherapie (Schnittmengen), sondern induziert ferner die Modulation neuer Gene. Aus n = 3 Versuchsansätzen.

Zusammengefasst rief VPA 1 mM eine stärkere Modulation der Genexpression hervor als VPA 0,25 mM, was sich auch in den Kombinationen mit IFN-alpha niederschlug. IFN-alpha allein verlor mit zunehmender Inkubationszeit deutlich an Wirkung auf die Expression. Jedoch in der Kombination mit VPA 1 mM steigerten sich die Veränderungen in der Genexpression und erreichten den höchsten nachgewiesenen Wert bei 5 Tagen (Abb. 23, untere Reihe).

In dem nachfolgenden Farbdigramm (Abb. 24) wurde exemplarisch die Regulation einiger Transkripte eines *Genclusters* in unbehandelten und behandelten Caki-1 Zellen zu den unterschiedlichen Zeitpunkten dargestellt. Die Expression von Genen, wie *Wnt3* (*wingless-type integration site family, member 3*), *DDX59* (DEAD Box Polypeptid 59), *Cdk3* (*cyclin-dependent kinase 3*) und die Chemokine CXCL3 bzw. CXCL2, waren nach der Applikation mit VPA 0,25 mM (Behandlungszeit-abhängig),

VPA 1 mM und den korrespondierenden Kombinationen signifikant reduziert. Die Expression dieser Gene nach der Behandlung mit IFN-alpha allein zeigte gegenüber den Kontrollen dabei keine Veränderung. Sowohl zwischen den 3 Sets (A, B und C) des gleichen Behandlungszeitpunktes als auch zwischen Proben unterschiedlicher Applikationszeiten bei gleicher Behandlung bestand dabei eine gute Korrelation.

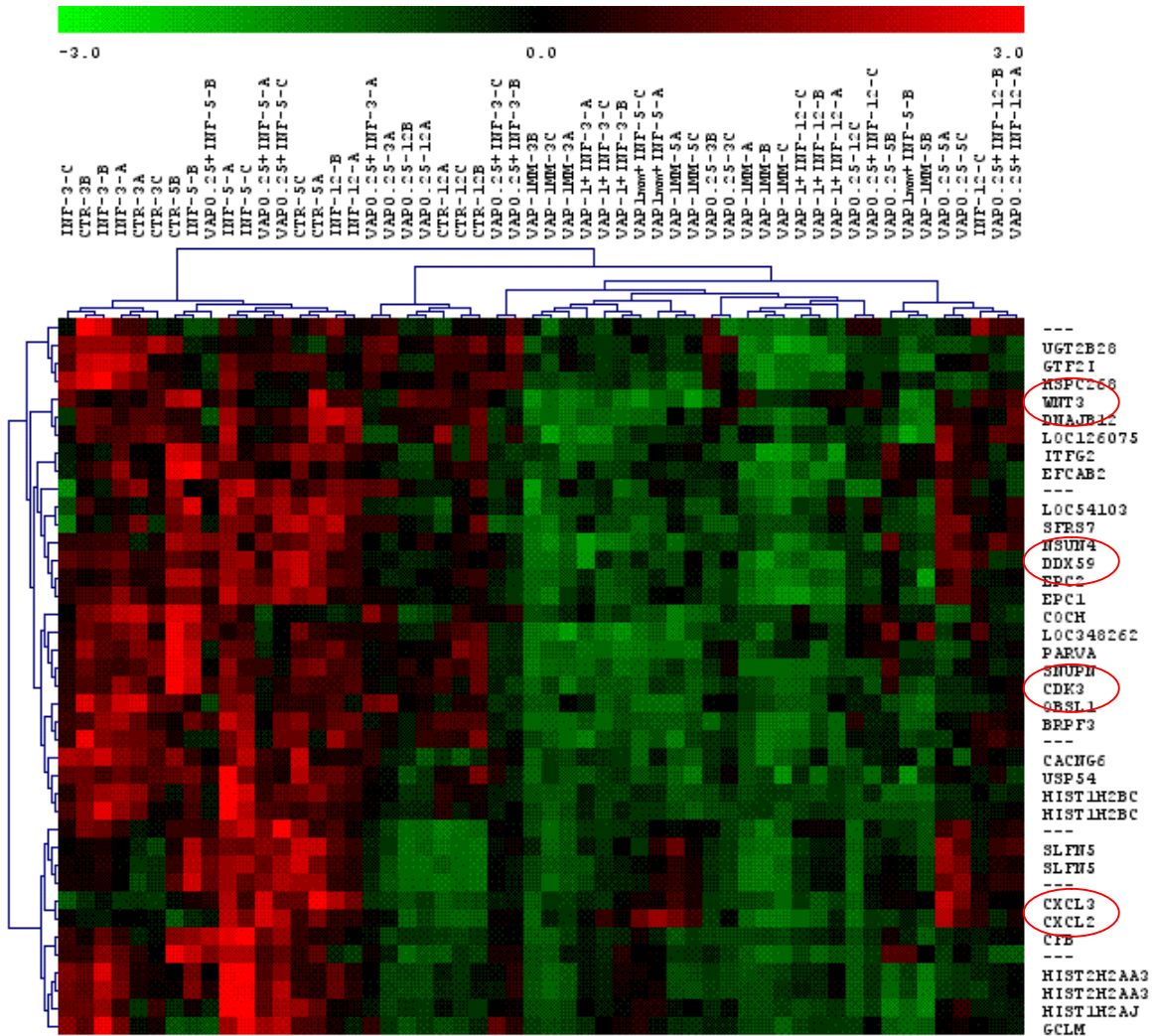


Abbildung 24: Genexpression un behandelter versus behandelter Caki-1 Zellen: *Microarray*-Analyse. Farbdigramm (= Heatmap): Ausschnitt der Daten. Rot = hochregulierte Gene, grün = runterregulierte Gene. Gute Korrelation zwischen den Proben gleicher Behandlung der drei Sets (A, B und C). Konzentrations-abhängige Reduktion der Genexpressionen durch VPA und die korrespondierenden Kombinationen. n = 3.

Aus der vorhandenen Datenmenge wurden annotierte, signifikant veränderte Gentranskripte (LCB > 1,2) herausgesucht, bei denen die Behandlung mindestens eine 5-fache Veränderung der Genexpression, verglichen mit der Kontrolle, induziert hatte (*fold change* > 5, siehe Anhang: Tab. 28-30). Hier wurden insbesondere deutlich veränderte Expressionen wichtiger funktioneller Gene näher betrachtet.

Verstärkende Effekte:

Nach 12-stündiger Behandlung überwog der Einfluss von IFN-alpha (Tab. 28). Dieser nahm mit zunehmender Behandlungszeit jedoch ab. VPA entfaltete seine Wirkung hingegen erst zu späteren Zeitpunkten. So resultierte die 12-stündige Behandlung mit IFN-alpha in einer signifikant gesteigerten Genexpression der CCL- und CXCL-Chemokine. Diese zeigte sich besonders bei CXCL10 und CXCL11 mit einer 79-fachen bzw. 89-fachen Erhöhung der Expression (Tab. 28). Nach 3-tägiger Anwendung setzte sich hingegen zunehmend ein inhibierender Einfluss des VPA durch (Tab. 29). Die Chemokine CCL2 und CCL5 wurden nach 3 Tagen und CCL2 ferner nach 5 Tagen durch VPA signifikant gehemmt, andere Chemokine waren nicht mehr detektierbar.

Des Weiteren konnte nach 12-stündiger Applikation eine signifikante Anregung der Genexpression Interferon-induzierter (IFI) und -stimulierter (z. B. ISG15) Proteine, Interleukine (IL), Interferon-regulierter (IRF7) und Tumor Nekrose Faktoren (TNF) sowie IFN-induzierten Guanylat Bindeprotein-1 (GBP1) und Angiopoetin-*like* 1 (ANGPTL1) durch IFN-alpha beobachtet werden (Tab. 28). Die Genexpression verstärkte sich dabei gegenüber den Kontrollen z. T. auf das 20-fache oder mehr. Zu allen Behandlungszeiten induzierte IFN-alpha ferner eine signifikante Expressionszunahme des DEAD Box Polypeptid 58 (DDX58), 2',5'-Oligoadenylat-Synthetasen (OAS1, 2, 3) und 2',5'-Oligoadenylat-Synthetase-*like* (OASL) sowie des XIAP-assoziierten Faktor-1 (XAF1). Dieser stimulierende Effekt fand sich auch in den Kombinationen mit VPA wieder. VPA allein zeigte dabei keine bzw. VPA 1 mM eine teilweise hemmende Wirkung.

Durch VPA allein wurde nach 12-stündiger Behandlung Konzentrations-abhängig eine signifikant gesteigerte Genexpression des Wnt-Signalweg-Inhibitors Dapper (DACT3) und Zytoskelett-assoziierten Genprodukte (CORO2A = Koronin-2A, KIF5C = Kinesin-Familienmitglied-5C) induziert (Tab. 28). Mit zunehmender Behandlungszeit nahm die Stimulation deutlich zu. Insbesondere die 5-tägige Gabe von VPA 1 mM resultierte in einer ausgeprägten Wirkung auf DACT3 (30-fach), CORO2A (16-fach) und KIF5C (20-fach, Tab. 30). In der Kombination mit IFN-alpha wurde die Expression in der Regel weiter verstärkt. Die Einzelapplikation mit IFN-alpha rief dabei keine Wirkung hervor.

Weiterhin zeigten die alpha-Integrine (ITGA) nach der Behandlung mit VPA eine signifikante Verstärkung der Genaktivität. Mit zunehmender Applikationszeit nahm

die Anzahl der Integrin-kodierenden Transkripte zu. Nach 3- und 5-tägiger Behandlung resultierten insbesondere VPA 1 mM und die entsprechende Kombination in einer signifikanten Stimulation der Expression von Integrin $\alpha 7$ (10- bzw. 13-fach, Tab 29 & 30). Die Expression der Integrine $\alpha 2$, $\alpha 4$, $\alpha 5$ und $\alpha 6$ wurden ebenfalls signifikant erhöht, jedoch moderater als Integrin $\alpha 7$ (Tab. 20 & 21). Die Kombination mit IFN-alpha verstärkte jeweils die Wirkung von VPA 1 mM. IFN-alpha allein zeigte dabei keinen Effekt.

Im späteren Verlauf der Behandlung (3 und 5 Tage, Tab. 29 & 30) induzierte VPA 1 mM darüber hinaus eine Expressionssteigerung des Kalzium/Kalmodulin-abhängigen Proteinkinase II Inhibitors (CAMK2N2, 6-fach), Kringle-enthaltenden Transmembranproteins 2 (KREMEN2, 28-fach), integralen Membranproteins 2A (ITM2A, 15-fach), WD *repeat* Domäne 69 (WDR69, 10-fach) und des Regulators des G-Protein Signalweges 4 (RGS4, 7-fach). Die korrespondierende Kombination mit IFN-alpha verstärkte die Effekte weiter, wobei IFN-alpha allein keine Wirkung zeigte.

Die Expression des Dopamin Rezeptor D1 interagierenden Proteins (DRD1IP, 50-fach, Tab. 29) und des *major histocompatibility complex class II* (HLA-DPA1 & -DPB1, 6- bzw. 16-fach, Tab. 29) wurde ausschließlich durch die Kombinationsbehandlung mit VPA 1 mM und IFN-alpha signifikant angeregt.

Die Applikation mit VPA und IFN-alpha induzierte des Weiteren eine gesteigerte Expression des Wachstum-assoziierten Proteins 43 (GAP43, 14-fach), Kollagen 28 (COL28A1, 12-fach), Kontaktin 1 (CNTN1, 24-fach) und Troponin I (TNNI3, 18-fach).

Hemmende Effekte:

Insbesondere nach längerer Inkubationszeit zeigten sich neben den stimulatorischen einige signifikant inhibitorische Effekte von VPA und IFN-alpha. VPA 1 mM und stärker die korrespondierende Kombination induzierten nach 3- und 5-tägiger Behandlung eine signifikante Reduktion der Alpha-1-Microglobulin/Bikunin Vorläufer (AMBP)-, der Claudin-2 (CLDN2)-, Ceruloplasmin (CP, Ferroxidase)- und Kernprotein-1 (NUPR1)-Expression. AMBP wurde dabei im Maximum 17-fach, CLDN2 9-fach, CP 38-fach und NUPR1 6-fach reduziert (Tab 29 & 30). IFN-alpha allein zeigte dabei keine Wirkung.

Die VPA-Behandlung resultierte Konzentrations-abhängig ferner in einer signifikanten Expressions-Hemmung von Spondin-2 (SPON2, Tab. 29) und der Discoidin Domäne Rezeptorfamilie 2 (DDR2, Tab. 30). Die Kombination mit IFN-alpha induzierte eine weitere Inhibition (SPON2 7-fach; DDR2 47-fach). Die Einzelapplikation mit IFN-alpha konnte auch hier keinen Effekt hervorrufen.

Die Expression des RAS-like (RASL11A, 8-fach, Tab. 29) und der Inositol 1,4,5-Trisphosphat 3-Kinase A (ITPKA, 11-fach, Tab. 30) wurde hingegen ausschließlich durch die Kombinationsbehandlung inhibiert.

Zusätzlich wurden veränderte Gentranskripte näher betrachtet, die für die biologische Funktion der Zelle von Bedeutung sind und bei der Karzinogenese eine Rolle spielen (Tab. 19-21). So induzierte VPA 1 mM die Reduktion der Expression weiterer entscheidender Gene, z. B. des Survivins (BIRC5, Tab. 19), des Adhäsionsmoleküls VCAM1 und des Wnt3 (Tab. 20 & 21). Die korrespondierende Kombination mit IFN-alpha verstärkte die inhibitorischen Effekte in der Regel weiter. IFN-alpha allein zeigte dabei keine Wirkung.

Die Expression des Chemokin-Rezeptors CXCR4, der Adhäsionsmoleküle NCAM1 und ICAM1 (Tab. 19) sowie des Mikrotubuli-assoziiertem Proteins tau (MAPT, Tab. 28) nahm interessanterweise nach 12-stündiger Applikation mit VPA und IFN-alpha zunächst zu, war nach längerer Behandlung jedoch nicht mehr detektierbar. Kurzzeitig konnte nach der Kombinationsbehandlung zudem eine signifikante Expressionssteigerung des FGF Bindeprotein-1 (FGFBP1, 82-fach, Tab. 30) beobachtet werden.

12 Stunden	IFN	VPA 0,25	0,25 + IFN	VPA 1	1 + IFN
ITGA2	2,4	1,6	2,0		1,8
ITGA2	1,9		1,8		
ITGB6				-2,1	
CD44				-1,6	
CD44				-1,8	
CD44				-2,3	-1,9
NCAM1				2,1	2,1
NCAM1				1,9	1,9
ICAM1	3,2		2,5		1,9
ICAM1	3,1		2,5		2,0
ICAM1	2,8		2,1		1,6
CCL2	9,5		6,0		
CCL5	4,0		2,3		
CCL5	4,0		2,3		
CXCL1	2,2				
CXCL2	2,7		1,9		
CXCL10	79,0		39,7		10,6
CXCL11	89,2		56,1		17,9
CXCL11	73,6		46,4		16,5
CXCL16	5,1		4,3		2,8
CXCR4		2,2	2,3	2,9	3,2
CXCR4		2,0	2,1	2,5	2,9
CXCR4		1,9	2,1	2,4	2,5
BIRC5				-2,0	-2,0

Tabelle 19: Microarray-Daten: Veränderte Gentranskripte nach 12-stündiger Applikation. *Fold change* > 1,5. Caki-1 Zellen nach VPA (0,25 bzw. 1 mM)- und/oder IFN-alpha (200 U/ml = IFN)-Behandlung. LCB > 1,2. ITGA = alpha-Integrin, ITGB = beta-Integrin, CD44, NCAM1, ICAM1 = Zelladhäsionsmoleküle, CCL, CXCL = Chemokine, CXCR4 = Chemokin-Rezeptor 4, BIRC5 = Survivin. Durchschnittswerte aus n = 3 Versuchen.

3 Tage	IFN	VPA 0,25	0,25 + IFN	VPA 1	1 + IFN
WNT3				-2,8	
ITGA2				1,8	
ITGA4		1,8	1,7	2,6	2,4
ITGA4		1,8		2,8	2,4
ITGA4				1,9	1,9
ITGA6				1,9	2,0
ITGA6				1,7	1,6
ITGA7				10,4	12,6
VCAM1				-2,2	-2,2
CCL2		-2,2	-2,6	-2,4	-3,3
CCL5		-2,6		-5,4	-2,6
CCL5		-3,7		-4,6	-2,7
CXCL1			1,7		2,1
CDK3				-3,9	-3,3

Tabelle 20: Microarray-Daten: Veränderte Gentranskripte nach 3-tägiger Applikation. *Fold change* > 1,5. Caki-1 Zellen nach VPA (0,25 bzw. 1 mM)- und/oder IFN-alpha (200 U/ml = IFN)-Behandlung. LCB > 1,2. WNT3 = *Wingless Int-1*, ITGA = alpha-Integrin, VCAM1 = vaskuläres Zelladhäsionsmolekül 1, CCL, CXCL = Chemokine, CDK3 = Zyklin-abhängige Kinase 3. Durchschnittswerte aus n = 3 Versuchen.

5 Tage	IFN	VPA 0,25	0,25 + IFN	VPA 1	1 + IFN
PDGFA				-2,0	-2,4
WNT3				-3,7	-4,0
ITGA2			1,7	2,4	2,3
ITGA4		2,1		4,6	5,3
ITGA4				3,7	4,4
ITGA4				3,6	4,1
ITGA5				1,9	2,3
ITGA6				2,1	
ITGA7				8,1	10,4
CD44	2,1				2,6
VCAM1				-2,9	
CCL2					-3,1
CCL5	5,4				
CCL5	3,7				
CDK3				-4,3	-3,8

Tabelle 21: *Microarray*-Daten: Veränderte Gentranskripte nach 5-tägiger Applikation. *Fold change* > 1,5. Caki-1 Zellen nach VPA (0,25 bzw. 1 mM)- und/oder IFN-alpha (200 U/ml = IFN)-Behandlung. LCB > 1,2. PDGFA = Wachstumsfaktor (*platelet derived growth factor A*), WNT3 = *Wingless Int-1*, ITGA = alpha-Integrin, CD44, VCAM1 = Zelladhäsionsmoleküle, CCL = Chemokine, CDK3 = Zyklin-abhängige Kinase 3. Durchschnittswerte aus n = 3 Versuchen.

Zusammengefasst wurde durch die Applikation mit VPA und IFN-alpha die Expression entscheidender Regulatoren der Proliferation, Migration, Adhäsion, Invasion etc. induziert. Nach längerer Behandlung konnte des Weiteren eine Expressions-Inhibition von Genen detektiert werden, deren Produkte mit Tumorgenese und -progression assoziiert sind. Die Kombinationsbehandlung zeigte dabei gegenüber der VPA-Monotherapie häufig eine deutliche Wirkungsverstärkung.

4.10.2 Verifizierung der *Microarray*-Daten mittels *Real Time qPCR*

Zur Verifizierung der gewonnenen *Microarray*-Daten ($p < 0,05$, LCB > 1,2) wurden aufgrund ihrer Bedeutung für Tumorgenese und -progression Gene der Chemokine und Integrine sowie Zelladhäsionsmoleküle der CAM-Familie mittels *Real Time qPCRs* (*RT qPCR*) untersucht. Die Angaben in den nachfolgenden Tabellen sind wie zuvor in *fold change* (Tab. 22-27). Als Veränderung galten *fold changes* > 1,5.

Auffallend starke Expressionsalterationen traten bei der *RT qPCR*, wie bei den *Microarray*-Analysen, insbesondere bei den Chemokinen CCL2, CXCL10 und CXCL11 sowie Integrinsubtyp $\alpha 7$ auf.

Der Anteil an CCL2- (19-fach), CXCL10- (116-fach) und CXCL11-Transkripten (124-fach) wurden, in guter Übereinstimmung mit den entsprechenden *Microarray*-

Daten, vor allem durch die 12-stündige Behandlung mit IFN-alpha allein signifikant erhöht (Tab. 22). VPA wirkte diesem Effekt in der Kombination entgegen.

CXCL1 und CXCL16 zeigten Verschiebungen in der Wirkungsweise von IFN-alpha und VPA, die in der *RT qPCR* sensitiver detektiert wurden als in den *Microrarrays* (Tab. 22-27). Auch die anfängliche Erhöhung der CXCR4-Transkription nach 12-stündiger und in der *RT qPCR* ferner nach 3-tägiger Behandlung (Tab. 22 & 24) konnte nachgewiesen werden.

Des Weiteren wurde die in den *Microrarrays* beobachtete Expressionssteigerung der Integrine $\alpha 2$, $\alpha 4$, $\alpha 6$ und $\alpha 7$ verifiziert. So war bereits nach 12-stündiger, stärker nach 3- und 5-tägiger Applikation mit VPA u. a. eine signifikante Zunahme der Transkripte von Integrin $\alpha 7$ zu beobachten (Tab. 22, 24 & 26). In der 3- und 5-tägigen Kombinationsbehandlung wurde diese Effekte weiter signifikant bis auf das 33-fache (VPA 1 mM, Tab. 24) erhöht.

Auch das Expressionsverhalten der Adhäsionsmoleküle NCAM1, ICAM1 und VCAM1 fand sich in der *RT qPCR* bestätigt. So wurden NCAM1 und ICAM1 nach 12 Stunden zunächst moderat erhöht (Tab. 22), später verlor sich dieser Effekt. VCAM1 wurde nach einer IFN-alpha-bedingten Stimulation bei 12 Stunden, nach längerer Applikation VPA-abhängig in seiner Expression inhibiert (Tab. 22). Insbesondere nach 5 Tagen zeichnete sich eine deutliche Hemmung des VCAM1 bei VPA-Gabe ab (Tab. 26). In den Kombinationen wirkte IFN-alpha VPA entgegen, so dass diese insgesamt geringere inhibierende Effekte erzielten.

Die Ergebnisse der *RT qPCR* verifizierten die vorhandenen *Microarray*-Daten, in der Regel mit erhöhter Sensitivität.

12 Stunden	IFN	VPA 0,25	0,25 + IFN	VPA 1	1 + IFN
CCL2	18,5		7,1		
CCL5	4,9		3,5		2,3
CXCL1	3,7		2,4		
CXCL2			-3,8	-4,2	
CXCL10	116,2		66,4	-2,0	17,0
CXCL11	123,6		34,1	-3,7	12,5
CXCL16	5,1		1,9	1,9	2,4
CXCR4	2,5	1,8	2,9	3,9	3,9
ITGA2	2,6	1,9	3,7	1,7	2,4
ITGA5	2,2	1,7	-13,0		1,7
ITGA7		3,9	3,9	10,9	8,3
ITGB6	1,5		-10,5	-2,0	-1,6
CD44	2,4		2,0	1,6	1,6
NCAM1	-1,6	2,0		3,1	2,0
VCAM1	3,8		3,4		1,5
ICAM1	4,6		3,3	2,2	1,9

Tabelle 22: RT qPCR: Fold change (> 1,5) der Transkription von Genen in Caki-1 Zellen nach 12-stündiger Applikation von VPA (0,25 bzw. 1 mM) und/oder IFN-alpha (200 U/ml = IFN) gegenüber den unbehandelten Caki-1 Zellen. Als Kontrolle diente das Haushaltsgen GAPDH. ITGA = alpha-Integrin, ITGB6 = beta-6 Integrin, CD44, NCAM1, ICAM1, VCAM1 = Zelladhäsionsmoleküle, CCL, CXCL = Chemokine, CXCR4 = Chemokin-Rezeptor 4. Rot-markierte Felder kennzeichnen Übereinstimmung mit den *Microarray*-Daten. Durchschnittswerte aus n = 3 Versuchen.

12 Stunden	IFN	VPA 0,25	0,25 + IFN	VPA 1	1 + IFN
CCL2	9,5		6,0		
CCL5	4,0		2,3		
CXCL1	2,2				
CXCL2	2,7		1,9		
CXCL10	79,0		39,7		10,6
CXCL11	89,2		56,1		17,9
CXCL16	5,1		4,3		2,8
CXCR4		2,2	2,3	2,9	3,2
ITGA2	2,4	1,6	2,0		1,8
ITGB6				-2,1	
CD44				-2,3	-1,9
NCAM1				2,1	2,1
ICAM1	3,2		2,5		1,9

Tabelle 23: *Microarray*-Daten – Verifizierung durch RT qPCR: Fold change (> 1,5) der Transkription von Genen in Caki-1 Zellen nach 12-stündiger Applikation von VPA (0,25 bzw. 1 mM) und/oder IFN-alpha (200 U/ml = IFN) gegenüber den unbehandelten Caki-1 Zellen. LCB > 1,2. Komprimierte Darstellung. ITGA2 = alpha-2 Integrin, NCAM1, ICAM1 = Zelladhäsionsmoleküle, CCL, CXCL = Chemokine, CXCR4 = Chemokin-Rezeptor 4. Rot-markierte Felder kennzeichnen Übereinstimmung mit den RT qPCR-Daten. Durchschnittswerte aus n = 3 Versuchen.

3 Tage	IFN	VPA 0,25	0,25 + IFN	VPA 1	1 + IFN
CCL2				-2,5	-1,8
CCL5	1,5	-2,0		-3,4	-1,6
CXCL1	1,5	-1,5	1,5		2,0
CXCL2	1,5		3,5		
CXCL10	6,2	5,7	9,4		3,7
CXCL11	7,9	7,3	18,5		3,6
CXCL16	2,3	2,9	4,6	3,6	3,7
CXCR4		2,9	1,9	4,5	4,4
ITGA2		2,0	1,9	10,5	13,2
ITGA4		2,0	2,8	3,0	1,2
ITGA5		1,6	1,7	1,6	1,8
ITGA6	1,6	2,1	4,6	4,6	4,1
ITGA7	3,4	10,6	21,7	24,7	32,5
ITGB6		2,1	2,6	2,2	2,0
CD44				-1,5	
NCAM1		3,8	2,5	3,6	2,0
VCAM1				-1,8	-1,6

Tabelle 24: RT qPCR: Fold change (> 1,5) der Transkription von Genen in Caki-1 Zellen nach 3-tägiger Applikation von VPA (0,25 bzw. 1 mM) und/oder IFN-alpha (200 U/ml = IFN) gegenüber den unbehandelten Caki-1 Zellen. Als Kontrolle diente das Haushaltsgen GAPDH. ITGA = alpha-Integrin, ITGB6 = beta-6 Integrin, CD44, NCAM1, ICAM1, VCAM1 = Zelladhäsionsmoleküle, CCL, CXCL = Chemokine, CXCR4 = Chemokin-Rezeptor 4. Rot-markierte Felder kennzeichnen Übereinstimmung mit den *Microarray*-Daten. Durchschnittswerte aus n = 3 Versuchen.

3 Tage	IFN	VPA 0,25	0,25 + IFN	VPA 1	1 + IFN
CCL2		-2,2	-2,6	-2,4	-3,3
CCL5		-2,6		-5,4	-2,6
CXCL1			1,7		2,1
ITGA2				1,8	
ITGA4		1,8	1,7	2,6	2,4
ITGA6				1,9	2,0
ITGA7				10,4	12,6
VCAM1				-2,2	-2,2

Tabelle 25: *Microarray*-Daten – Verifizierung durch RT qPCR: Fold change (> 1,5) der Transkription von Genen in Caki-1 Zellen nach 3-tägiger Applikation von VPA (0,25 bzw. 1 mM) und/oder IFN-alpha (200 U/ml = IFN) gegenüber den unbehandelten Caki-1 Zellen. LCB > 1,2. Komprimierte Darstellung. ITGA = alpha-Integrin, VCAM1 = vaskuläres Zelladhäsionsmolekül 1, CCL, CXCL = Chemokine. Rot-markierte Felder kennzeichnen Übereinstimmung mit den RT qPCR-Daten. Durchschnittswerte aus n = 3 Versuchen.

5 Tage	IFN	VPA 0,25	0,25 + IFN	VPA 1	1 + IFN
CCL2					-3,5
CCL5	1,6	-4,8		-5,9	-3,3
CXCL2		-6,1	-2,3	-24,9	-3,5
CXCL10	1,6	-1,8	2,1	-1,8	
CXCL11	1,7		2,0	-4,1	-1,8
CXCL16	1,6	-1,7	1,5	-1,6	1,7
CXCR4	-2,4	-2,0	-1,5		
ITGA2				3,1	1,5
ITGA4	-1,9		2,2	5,9	3,4
ITGA5			1,6	1,8	1,6
ITGA6			1,7	1,5	2,1
ITGA7		2,8	4,5	5,7	14,3
ITGB6				1,9	
NCAM1	-3,2	-1,7	-2,6		-4,2
VCAM1	1,6	-5,5	-1,9	-3,0	-2,8

Tabelle 26: RT qPCR: Fold change (> 1,5) der Transkription von Genen in Caki-1 Zellen nach 5-tägiger Applikation von VPA (0,25 bzw. 1 mM) und/oder IFN-alpha (200 U/ml = IFN) gegenüber den unbehandelten Caki-1 Zellen. Als Kontrolle diente das Haushaltsgen GAPDH. ITGA = alpha-Integrin, ITGB6 = beta-6 Integrin, CD44, NCAM1, ICAM1, VCAM1 = Zelladhäsionsmoleküle, CCL, CXCL = Chemokine, CXCR4 = Chemokin-Rezeptor 4. Rot-markierte Felder kennzeichnen Übereinstimmung mit den *Microarray*-Daten. Durchschnittswerte aus n = 3 Versuchen.

5 Tage	IFN	VPA 0,25	0,25 + IFN	VPA 1	1 + IFN
CCL2					-3,1
CCL5	5,4				
ITGA2			1,7	2,4	2,3
ITGA4		2,1		4,6	5,3
ITGA5				1,9	2,3
ITGA6				2,1	
ITGA7				8,1	10,4
CD44	2,1				2,6
VCAM1				-2,9	

Tabelle 27: *Microarray*-Daten – Verifizierung durch RT qPCR: Fold change (> 1,5) der Transkription von Genen in Caki-1 Zellen nach 5-tägiger Applikation von VPA (0,25 bzw. 1 mM) und/oder IFN-alpha (200 U/ml = IFN) gegenüber den unbehandelten Caki-1 Zellen. Komprimierte Darstellung. ITGA = alpha-Integrin, CD44, VCAM1 = Zelladhäsionsmoleküle, CCL = Chemokine. Rot-markierte Felder kennzeichnen Übereinstimmung mit den RT qPCR-Daten. Durchschnittswerte aus n = 3 Versuchen.

4.11 In vivo Studien am xenogenen Mausmodell

Zur Vertiefung der in vitro Studien wurden tierexperimentelle Studien an xenogen transplantierten Nacktmäusen durchgeführt. Den Versuchstieren wurden dazu humane Caki-1 Zellen transplantiert und nachdem diese palpabel geworden waren, mit VPA und IFN-alpha behandelt. Die Effekte auf das Tumorwachstum und die Expression regulatorischer Proteine wurden darauf folgend evaluiert. Die Einzelapplikation mit VPA 200 mg/kg Körpergewicht induzierte eine signifikante Reduktion des Tumolvolumens. Dieses zeigte an Tag 46 der Behandlung eine 70 %ige Verminderung gegenüber den Tumoren der unbehandelten Kontrolltiere (Abb. 25).

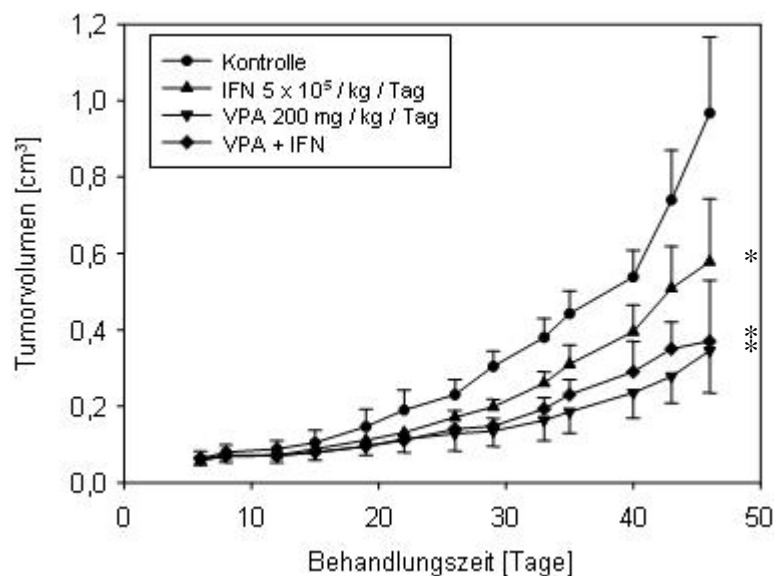


Abbildung 25: Tumorwachstum xenogen transplantierte Caki-1 Zellen in Nacktmäusen: Am Tag 46 konnte eine signifikante 70 %ige Reduktion des Wachstums nach VPA 200 mg/kg Körpergewicht Einzelapplikation und nach Kombination mit IFN-alpha 5×10^5 U/kg Körpergewicht beobachtet werden. IFN-alpha 5×10^5 U/kg Körpergewicht allein induzierte ebenfalls eine Hemmung. Die Wachstumsreduktionen wurde zwischen Tag 10 und 20 messbar und am Tag 26 signifikant. Durchschnittswerte von $n = 8-10$ Versuchstieren mit Standardabweichung und Signifikanz *.

Auf der Proteinebene assoziierte diese mit einer auffallend starken Zunahme von p21 und Bax (Abb. 26). Des Weiteren konnte eine erhöhte Expression von Cyclin D3 und Rb sowie eine Reduktion von Cdk1 detektiert werden. Die Kombination von VPA mit IFN-alpha bewirkte ebenfalls eine signifikante Inhibition des Tumolvolumens, die gegenüber der VPA-Einzelapplikation jedoch nicht stärker ausgeprägt war (Abb. 25). Die Kombinationsbehandlung ging mit einer weiteren Hemmung der Cdk1- und Erhöhung der Bax-Expression einher (Abb. 26). Die zusätzliche Gabe von IFN-alpha induzierte ferner die Inhibition von Cdk4, Bcl-2 und HDAC3. Die durch VPA induzierte Expression von p21 wurde in der Kombination

mit IFN-alpha revertiert. Die Einzelapplikation mit IFN-alpha 5×10^5 U/kg Körpergewicht resultierte in einer dezenten Inhibition des Tumolvolumens gegenüber den unbehandelten Kontrollen (Abb. 25). Diese korrelierte mit einer Hemmung des Proteingehalts von Cdk1 und Bcl-2 sowie einer Stimulation von Cyclin D3, Bax und Rb (Abb. 26). Die Versuchstiere wiesen im Verlauf der Studie keine Nebenwirkungen wie etwa Gewichtsverlust oder Diarrhö auf.

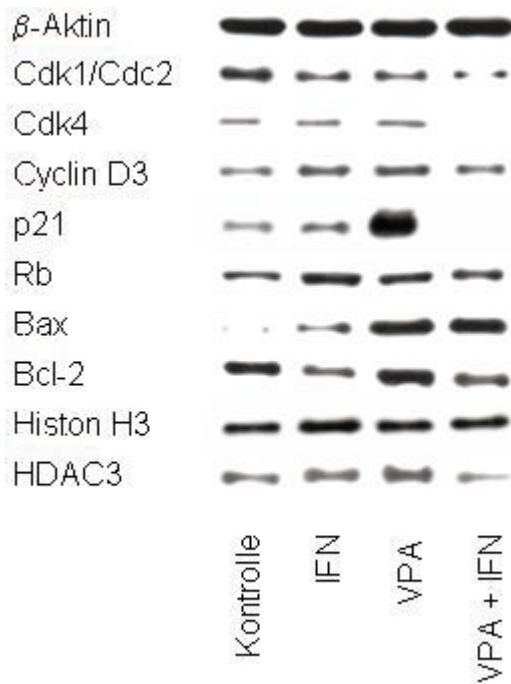


Abbildung 26: Expression regulatorischer Proteine aus Tumoren xenogen mit Caki-1 Zellen transplantierte Nacktmäuse. Western Blot Analyse. Nach 46-tägiger Behandlung mit VPA 200 mg/kg Körpergewicht und IFN-alpha 5×10^5 U/kg Körpergewicht. Verifiziert wurde die deutliche Expressionsmodulation der Zellzyklusproteine CDK1/Cdc2, Cdk4, Cyclin D3, p21 und Rb, der in die Apoptose involvierten Proteine Bax, Bcl-2 sowie Histon H3 und HDAC3. β-Aktin diente als Kontrolle. Pro Probe wurden 50 µg Protein eingesetzt.

5 Diskussion

Ein verbessertes Verständnis der dem NZK zugrunde liegenden Ursachen hat zur Entwicklung innovativer Therapieansätze geführt. Neue potentiell viel versprechende Therapeutika, die in relevante biologische Mechanismen eingreifen, werden derzeit entwickelt und untersucht. Zu ihnen zählen insbesondere epigenetische Agenzien. In der Tat sind epigenetische Alterationen, wie die verstärkte Expression von HDAC, kennzeichnend für die verschiedensten Tumorentitäten (Bolden et al. 2006). Diese gehen mit einer pathologisch veränderten Gentranskription einher und stellen eine typische Ursache für Tumorgenese und -progression dar (Lui et al. 2006, Bolden et al. 2006, Hanahan et al. 2000). Da epigenetische Modifikationen potentiell reversibel sind, repräsentieren HDAC-Inhibitoren eine viel versprechende Gruppe neuer Therapeutika. Der HDAC-Inhibitor VPA zeichnet sich dabei gegenüber den anderen in der Entwicklung befindlichen HDAC-Inhibitoren durch eine Reihe von Vorteilen aus. So durch sein günstiges Sicherheitsprofil und die Tatsache, dass er bereits als Anti-Epileptikum in der Klinik etabliert ist. Forderungen insbesondere nach Kombinationstherapien mit HDAC-Inhibitoren werden laut (z. B. Santini et al. 2007, Atmaca et al. 2007). Neuste Untersuchungen deuten daraufhin, dass die Kombination von VPA mit anderen Therapeutika synergistische anti-tumorale Effekte induzieren kann (z. B. Mologni et al. 2008, Kuendgen et al. 2007, Münster et al. 2007). Erste Daten geben Grund zu der Annahme, dass die Kombinationstherapie von VPA mit niedrig konzentriertem IFN-alpha effizient sein könnte. In Neuroblastomzellen konnte gezeigt werden, dass IFN-alpha die anti-tumorale Aktivität von VPA signifikant verstärkt, wobei es allein keine Effekte hervorrief (Cinatl et al. 2002). VPA und IFN-alpha induzierten ferner eine synergistische Wachstums-Hemmung von xenogen transplantierten Neuroblastomzellen in vivo (Michaelis et al. 2004). In zwei von sechs Tieren resultierte die Behandlung dabei in einer vollständigen Tumorremission, wohingegen die VPA-Monotherapie das Tumorstadium lediglich inhibierte. IFN-alpha konnte zudem die anti-angiogene Wirkung von HDAC-Inhibitoren in transgenen Mäusen mit Neuroblastom (Kuljaca et al. 2007) sowie die Wachstums- und Invasions-Hemmung in Lungen- bzw. Lebertumorzellen verstärken (Kaneko et al. 2004, Yamamoto-Yamaguchi et al. 2003). Durch die bereits vorhandene klinische Etablierung von VPA und IFN-alpha wäre die therapeutische Anwendung beider Agenzien schnell umsetzbar.

5.1 Proliferations-Inhibition nach VPA-Behandlung – Synergie durch Kombination mit IFN-alpha

In der vorliegenden Studie induzierte VPA Zeit-abhängig bei allen NZK-Zelllinien gleichermaßen signifikante anti-proliferative Effekte. VPA führte dabei jedoch nicht unmittelbar zu biologischen Veränderungen. Vielmehr scheint eine längere VPA-Applikation notwendig, um das Tumorwachstum zu hemmen. In guter Übereinstimmung mit unserer Beobachtung haben frühere Untersuchungen gezeigt, dass VPA erst nach längerer Gabe seine biologische Wirkung entfaltet (Blaheta et al. 2007, Xia et al. 2006, Beecken et al. 2005).

Da alle NZK-Zelllinien gleichermaßen auf die VPA-Behandlung reagierten, unabhängig davon ob sie VHL-positiv oder –negativ waren, lässt dies darauf schließen, dass VPA seinen anti-proliferativen Einfluss VHL-unabhängig induziert. Tatsächlich konnten auch weitere Arbeitsgruppen nachweisen, dass anti-proliferative Effekte im NZK VHL-unabhängig waren (Costa et al. 2007, Rini et al. 2006). VPA könnte dabei wie andere HDAC-Inhibitoren die Fähigkeit haben, die Expression von HIF-1 α auf andere Weise als durch VHL zu hemmen (Mayo et al. 2003).

Das Proliferationsverhalten der PTC-Zellen, die als Kontrolle für normale Nierenzellen fungierten, wurde durch VPA nicht verändert. Die Applikation mit VPA und IFN-alpha könnte somit spezifisch das Wachstum von NZK-Zellen inhibieren und normale Nierenzellen unbeeinflusst lassen. Inwieweit dies auch auf andere normale Zellen zutrifft ist jedoch noch nicht abgesichert. So haben Studien mit VPA an HUVEC gezeigt, dass VPA einen anti-angiogenen Effekt induziert, d. h. auf Endothelzellen einzuwirken vermag (Michaelis et al. 2004).

Analysen der Zellzyklusphasen erfolgten an synchronisierten Tumorzellen. Zur Synchronisation wurde Aphidicolin verwendet, welches Zellen über eine reversible Hemmung der DNA-Polymerase in der frühen S-Phase blockt. Die präsentierten Ergebnisse mögen unter diesem Aspekt widersprüchlich erscheinen, demonstrieren sie doch unter Kontrollbedingungen 4 Stunden nach Absetzen des Aphidicolins einen hohen Anteil an S-Phase Zellen (3 Tage Ansatz). Bei der Interpretation der Daten ist jedoch zu berücksichtigen, dass die Zellzyklusanalyse anhand der Kerngröße erfolgte. Diese unterscheidet sich in der frühen S-Phase (G1-S-Übergang) nicht wesentlich von der frühen G1-Phase. Erst in der vorangeschrittenen S-Phase kommt es zu einer signifikanten Zunahme der Kerngröße, die sich in der Durchflusszytometrie erfassen lässt. Entsprechend sind die vorliegenden Daten zur

S-Phase auf die vorangeschrittene S-Phase zu beziehen. Unter Berücksichtigung dieser Gesichtspunkte korrelierten die anti-proliferativen Effekte von VPA auf die Tumorzellen mit einer Verringerung des Anteils an Zellen in der S-Phase und einer Zunahme an G0/G1-Phase-Zellen. Der Anteil an Kontrollzellen in der S-Phase war nach 5-tägiger Inkubation geringer als nach 3-tägiger Behandlung. Ursache für diese Beobachtung mag sein, dass Caki-1 Zellen nach 5 Tagen aufgrund höherer Konfluenz und/oder verringerter Nährstoffzufuhr bereits eine gewisse Wachstums-Hemmung aufwiesen. Trotzdem ist die prozentuale Reduktion von S-Phase-Zellen nach 5 Tagen durch VPA ausgeprägter, als nach 3 Tagen.

Parallel zu der Proliferations-Hemmung und der Verschiebung der Zellzyklusphasen wurden regulatorische Zellzyklusproteine modifiziert. Caki-1 Zellen zeigten Behandlungszeit-unabhängig eine verstärkte Expression von p27, Cyclin D3, Rb und Rb2. Der Verlust von p27 gilt als unabhängiger Risiko- bzw. Prognosefaktor für das Überleben bei Tumorerkrankungen der Niere (Pertia et al. 2007, Langner et al. 2004, Hedberg et al. 2002, Migita et al. 2002). Dabei besteht eine inverse Korrelation zwischen Tumorgröße und p27-Expression (Migita et al. 2002). Auch konnte eine Kausalität zwischen p27-Expression und verringerter Tumorgöße in NZK und gastrointestinalen Tumoren beobachtet werden (Draper et al. 2008, Hedberg et al. 2002). Neue Daten belegen dabei einen direkten Zusammenhang zwischen p27 und Cyclin D3 in gastrointestinalen und ovarialen Tumoren (Draper et al. 2008, Levidou et al. 2007). Eine erhöhte Cyclin D3-Expression assoziierte beim ovarialen Adenokarzinom mit weniger malignen Tumoren und verbesserter Überlebensprognose der Patienten (Levidou et al. 2007). In Karzinomen der Prostata (Olshavsky et al. 2007), der Haut (Rojas et al. 2007) und des Pankreas (Tsutsumida et al. 2006) ging eine gesteigerte Cyclin D3-Expression mit einer Proliferations-Inhibition und verringertem Metastase-Potential einher. Immunhistochemische Studien des NZK zeigten zwar in 16 % der Tumoren mit verstärkter Proliferation eine signifikante Erhöhungen des Cyclin D3-Gehalts (Hedberg et al. 2002, 2002a), ein Zusammenhang zwischen Cyclin D3-Stimulation und verringertem Überleben konnte jedoch nicht nachgewiesen werden (Hedberg et al. 2002a). In guter Übereinstimmung mit unseren Daten induzierte die Applikation mit VPA in C6 Gliomen eine deutliche Zunahme an Cyclin D3. Diese korrelierte mit einer Reduktion des proliferativen Zellkern-Antigens (PCNA), notwendig für die aktive G1-Phase des Zellzyklus (Bacon et al. 2002). Neben dem genannten Zusammenspiel von Cyclin D3 und p27 besteht ein weiterer positiver Zusammenhang zwischen Cyclin D3 und dem Rb-Protein (Levidou et al. 2007). Rb, das Retinoblastom Protein, ist ein Tumorsuppressor, der transkriptional

inhibierend auf die Proliferation wirkt. Die Rb-Expression wurde in NZK-Zellen bisher noch nicht evaluiert, in Gewebe von NZK-Patienten konnte jedoch ein verringertes Rb-Gehalt nachgewiesen werden (Hedberg et al. 2002a). Die Applikation von Melanomzellen mit dem HDAC-Inhibitor VPA (Valentini et al. 2007) sowie von Prostatatumoren mit Natrium-Butyrat und Tributyrin (Kuefer et al. 2004), resultierte in einer verstärkten Rb-Expression, die mit einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase sowie einer Inhibition der Proliferation assoziiert war (Takaki et al. 2004, Wang et al. 2001). Das dem Rb strukturell ähnliche Rb2, welches vermutlich vergleichbare Funktion hat, zeigte ebenfalls eine deutliche Expressionssteigerung unter VPA. Aufgrund der eigenen sowie anderer Daten lässt sich postulieren, dass VPA über eine vermehrte Präsentation der Zellzyklusproteine p27, Cyclin D3 und Rb inhibierend auf den Zellzyklus einwirkt. Dabei induziert VPA insbesondere eine Verschiebung der Zellen in die G0/G1-Phase, die in einer Proliferations-Hemmung im NZK resultiert.

Die Expression des Tumorsuppressors p21 konnte in diversen Tumorentitäten durch VPA induziert werden (Hrzenjak et al. 2006, Trus et al. 2005, Drescher et al. 2005). Die Anregung der p21-Expression und des durch p21 eingeleitete Zellzyklusarrest werden als allgemeine Wirkmechanismen von HDAC-Inhibitoren angesehen (Richon et al. 2000). In der vorliegenden Studie wurde die p21-Expression nach 3-tägiger VPA-Applikation in vitro deutlich verstärkt. Nach 5 Tagen hingegen war kein Effekt bzw. eine dezente Inhibition zu beobachten. Interessanterweise nahm die p21-Expression der unbehandelten Kontrollzellen nach 5 Tagen zu. Eine mögliche Erklärung für das inverse Verhalten von VPA wäre, dass VPA nur stimulierend auf p21 wirkt, wenn es in den Zielzellen nicht oder nur sehr moderat exprimiert wird. Kuljaca postulierte, dass die basale Expression von p21 in der Tumorzelle Einfluss auf die Sensitivität gegenüber HDAC-Inhibitoren hat (Kuljaca et al. 2007). Sie hatten ein ähnliches Phänomen in einer Studie mit dem HDAC-Inhibitor TSA und IFN-alpha an Brust-, Lungen, Prostata- und Kolonkarzinomzellen beobachtet (Kuljaca et al. 2007).

VPA bewirkte ferner Modulationen der Cyclin A-, Cyclin B-, Cdk1-, Cdk2- und Cdk4-Expression, weiteren Mediatoren des Zellzyklus. Cyclin A und Cdk2, die zusammen einen Komplex bilden, sowie Cdk4 sind in den Übergang von der G1- in die S-Phase involviert (z. B. Merrick et al. 2008). Sie wurden durch VPA deutlich reduziert. Cyclin A war nach 5 Tagen überhaupt nicht mehr detektierbar. Die Daten stehen in guter Übereinstimmung mit der gemessenen Reduktion an Caki-1 in der

S-Phase nach VPA-Behandlung. Die Kombination mit IFN-alpha induzierte eine weitere Verminderung der genannten Proteine, mit Ausnahme von Cyclin A. IFN-alpha allein zeigte dabei keine Wirkung. In Lungentumorzellen war nach Kombinationsbehandlung mit COX-2-Inhibitoren und IFN-alpha ebenfalls eine Inhibition der Proliferation beobachtet worden, die mit einer Verringerung von Cdk2 und Cdk4 einherging (Lee et al. 2005). Cdk4 wurde dabei u. a. durch p27 inhibiert (Takaki et al. 2009). Die Verstärkung der anti-proliferativen Effekte durch IFN-alpha wird daher, neben weiteren Mechanismen, womöglich über eine Hemmung der Cdk2- und Cdk4-Expression induziert.

Cyclin A geht neben Cdk2 einen Komplex mit Cdk1 in der frühen S-Phase ein. Cdk1 wurde jedoch durch VPA nach 3 Tagen nicht verändert und nach 5 Tagen erhöht. Cyclin A wurde zu diesem Zeitpunkt nicht mehr exprimiert, was dafür spricht, dass sich Cdk1 bereits im Komplex mit Cyclin B befand. Cyclin B bildet mit Cdk1 in der späten S-Phase einen Komplex (z. B. Katsuno et al. 2009) und spielt eine entscheidende Rolle in der G2/M-Phase (z. B. Choi et al. 2009). Tatsächlich war nach 5 Tagen VPA-Applikation eine verstärkte Cyclin B-Expression, analog zu Cdk1, detektierbar. Auf die Proliferation wirkte sich diese jedoch nicht aus, unter Umständen durch die insgesamt verringerte basale Expression von Cyclin B und Cdk1. So können Unterschiede der basalen Expression Ursache in einem veränderten Ansprechen auf HDAC-Inhibitoren resultieren (Kuljaca et al. 2007). Denkbar wäre zudem, dass Rückkopplungsschleifen zur Gegenregulation der genannten Effekte führten.

Die Kombination von VPA und IFN-alpha war ebenfalls mit einer erhöhten Expression von Cyclin D3, Rb und Rb2 und einer Hemmung von Cdk2, Cdk4 assoziiert. Wie oben erwähnt können diese Alterationen der Proteinexpression zum Zellzyklusarrest in der G1-Phase führen. Tatsächlich gingen auch hier die Veränderungen der regulatorischen Zellzyklusproteine mit einer Akkumulation der Caki-1 Zellen in der G0/G1-Phase bzw. einer Reduktion der Zellen in der S-Phase einher. Diese wiederum resultierte in einer weiteren Inhibition der Proliferation, die signifikant stärker ausgeprägt war als nach VPA-Einzelapplikationen. IFN-alpha allein resultierte dabei in keiner Wachstums-Hemmung. Die durch die Kombination detektierten anti-proliferativen Effekte waren somit deutlich effizienter, wenn auch bereits die VPA-Monobehandlung eine signifikante Wirkung erzielte.

Da VPA und IFN-alpha keine Apoptose-Induktion in den NZK-Zellen bewirkten, resultierte die gemessene Reduktion der behandelten NZK-Zellen allein aus der Inhibition der Proliferation.

5.2 Adhäsion und Invasion nach VPA- und IFN-alpha-Gabe, Modulation der korrespondierenden Signaltransduktion

Die Adhäsion zirkulierender NZK-Zellen an vaskuläres Endothel und die Invasion durch die basale Membran sind entscheidende Schritte der hämatologischen Metastasierung (Jin et al. 2006). In der vorliegenden Arbeit induzierte VPA eine signifikante Blockade der Adhäsion an Endothelzellen und die extrazellulären Matrixproteine (EZM) Kollagen und Fibronectin. Die Effekte waren Konzentrations- und Behandlungszeit-abhängig, analog zu den Proliferationsstudien, in denen VPA nach längerer Applikation ebenfalls deutlichere Wirkung erzielte.

Die anti-adhäsiven Eigenschaften waren, wie zuvor bei der Proliferation, bei allen NZK-Zelllinien gleichermaßen detektierbar. Das Adhäsionsverhalten der PTC-Zellen zeigte hingegen keine Alterationen nach VPA-Gabe. Daher liegt die Vermutung nahe, dass VPA in erster Linie die Anheftung maligner Zellen hemmt.

Die Adhäsions-hemmenden Phänomene gingen mit einer signifikanten Zunahme intrazellulären F-Aktins einher. In der Literatur wird die Polymerisation des F-Aktins kontrovers diskutiert, grundsätzlich jedoch mit der Ausbildung von Stressfasern (Jia et al. 2009, Machesky et al. 1997) und damit einhergehender verminderter Motilität der Zellen assoziiert (Lin et al. 2009, Yuan et al. 2008). Aktuelle Studien konnten zeigen, dass die Formierung von Aktin-Stressfasern mit einer Hemmung der Invasion und Motilität unterschiedlichster Tumorzellen (Brew et al. 2009, Klein et al. 2009, Wong et al. 2009, Windhorst et al. 2008) korreliert. Basierend auf diesen Beobachtungen ist die Ausbildung von Stressfasern und eine Motilitäts-Verminderung aufgrund der Polymerisation des F-Aktins in den NZK-Zellen durch VPA denkbar. Inwieweit sich diese Hypothese im NZK bestätigen lässt und welche Aktin-Bindeproteine und Rho-Kinasen in diesen Vorgang involviert sind, bedarf weiterer Klärung.

Durch die additive Gabe von IFN-alpha wurde die Adhäsion an Endothel und an EZM-Proteine weiter inhibiert, der F-Aktin-Gehalt jedoch nicht weiter erhöht. IFN-alpha scheint also nicht über eine verstärkte F-Aktin-Modulation auf das adhäsive Verhalten der Tumorzellen einzuwirken. Dabei induzierte IFN-alpha allein eine

Alteration des F-Aktins. Hier scheinen sich Beobachtungen anderer Studien zu bestätigen. Sie berichten, dass die additive Gabe von IFN-alpha insbesondere eine Wirkungsverstärkung von Effekten erzielt, die bei alleiniger IFN-alpha-Applikation nicht hervorgerufen werden konnten (Lee et al. 2006, Cinatl et al. 2002, Lucero et al. 2001, Okamoto et al. 1996).

Adhäsionsrezeptoren

Integrine spielen eine Schlüsselrolle bei der Adhäsion, Migration, Metastasierung, Differenzierung, Proliferation und dem Überleben von Zellen (Moschos et al. 2007, Guo et al. 2004). Sie sind dabei u. a. in die Reorganisation der Aktinfilamente, bzw. die Ausbildung von Stressfasern involviert (Machesky et al. 1997). Tumorzellen modifizieren Integrine in Abhängigkeit von ihrem Malignitätsgrad (Guo et al. 2004). VPA resultierte in einer signifikant erhöhten Oberflächenexpression der Integrin-subtypen $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 3$, $\alpha 5$, und $\beta 3$. Frühere Studien haben gezeigt, dass VPA über eine Veränderung der Integrinexpression die Interaktion von NZK-Zellen mit vaskulärem Endothel blockiert (Oertl et al. 2006). Welche Subtypen wie im NZK in die Migration und das maligne Verhalten involviert sind, ist noch nicht vollständig geklärt. Jedoch konnte eine verminderte $\alpha 3$ -, $\alpha 5$ - und $\alpha 6$ -Expression in hochgradig malignen NZK detektiert werden (Markovic-Lipkovski et al. 2001). Des Weiteren wurde die Kausalität zwischen verringerter Oberflächenexpression von $\alpha 2$, $\alpha 3$ und $\alpha 5$ und transendothelialer Migration der NZK-Zellen hergestellt (Jones et al. 2007). Eine verstärkte Präsenz der Integrine an der Oberfläche durch VPA könnte daher der migratorischen Aktivität der NZK-Zellen entgegen wirken. Verschiedene Untersuchungen lassen darauf schließen, dass eine Integrininternalisation die Metastasierung begünstigt, wohingegen die Translokation an die Zellmembran Tumorzellen an der Invasion durch das Endothel hindert (Winterwood et al. 2006, Skalski et al. 2005, Powelka et al. 2004). Tatsächlich korrelierte in der vorliegenden Studie die gesteigerte Oberflächenexpression mit einer verminderten intrazellulären Expression der Integrin-subtypen $\alpha 3$, $\beta 3$ und $\beta 4$. Daraus lässt sich schlussfolgern, dass VPA womöglich über eine veränderte Integrinexpression Einfluss auf die Adhäsionsdynamik nimmt.

Die Kombination mit IFN-alpha bewirkte eine weitere Verstärkung der beschriebenen Effekte auf die Expression der Integrine $\alpha 1$, $\alpha 2$, $\alpha 5$, $\beta 3$ und $\beta 4$. Es sollte dabei Erwähnung finden, dass bereits die geringere VPA-Konzentration von 0,25 mM eine deutliche Wirkung zeigte. Offensichtlich reicht in der Kombination eine niedrigere VPA-Dosis aus, um eindeutige anti-tumorale Effekte zu induzieren.

Die Integrin-abhängige Adhäsion erfolgt im engen Zusammenhang mit den regulierenden Proteinen ILK und FAK. In den verschiedensten Tumorentitäten konnte der Einfluss dieser Proteine auf die Tumorprogression nachgewiesen werden (Brenner et al. 2008, Okamura et al. 2007, Shi et al. 2007, Thamilselvan et al. 2007, Jones et al. 2007a, Kato et al. 2006, Zeng et al. 2006, Graff et al. 2001). Frühere Studien haben gezeigt, dass die Expression von ILK und FAK im NZK (Agouni et al. 2007, Satoh et al. 2000) sowie ILK in Lungentumoren (Okamura et al. 2007) mit verstärkten malignen Eigenschaften und schlechter Prognose assoziiert sind. FAK und ILK sind dabei auch in die Proliferation und das Überleben der Zellen involviert (Jones et al. 2007a, Agouni et al. 2007, Desban et al. 2006, Manohar et al. 2004). Untersuchungen an Kolonkarzinomzellen wiesen nach Behandlung mit dem HDAC-Inhibitor Butyrat eine Reduktion von FAK und der aktivierten Form pFAK auf (Lee et al. 2005). In der vorliegenden Studie konnte neben den quantitativen Expressionsveränderungen der Integrinsubtypen, insbesondere nach gekoppelter VPA- und IFN-alpha-Applikation, eine starke Reduktion von FAK und pFAK sowie eine moderate Inhibition der ILK-Expression beobachtet werden. Offensichtlich nimmt VPA somit Einfluss auf den Integrin-Signalweg. IFN-alpha verstärkte dabei die VPA-Effekte, ohne allein Veränderungen zu induzieren. Eine Kausalität zwischen der Inhibition von ILK, FAK und pFAK durch VPA und IFN-alpha und dem beobachteten verminderten Adhäsions- und Proliferationspotential der NZK-Zellen liegt daher nahe.

CD44-Proteine sind an einer ganzen Reihe von zellulären Aktivitäten beteiligt und nehmen ebenfalls Einfluss auf die Invasionsdynamik, Proliferation und das Überleben von Zellen. CD44-Dysfunktionen gelten als maßgeblich für die Tumorprogression (Marhaba et al. 2004). In der vorliegenden Studie induzierte VPA und die korrespondierende Kombination mit IFN-alpha eine signifikant verstärkte Oberflächenpräsenz der CD44-Proteine. Interessanterweise zeigte die Einzelapplikation mit IFN-alpha dabei ebenfalls eine signifikante Stimulation, die in den Kombinationen intensiviert wurde. Somit beeinflusst bereits IFN-alpha allein Prozesse, die für die Adhäsion von Relevanz sein können.

In guter Übereinstimmung mit unseren Daten wurde im NZK-Gewebe der Zusammenhang zwischen erhöhter CD44 V5-Expression und verminderter Mortalität und Invasion sowie einer signifikant verbesserten 5- bzw. 10-Jahres-Überlebensrate nachgewiesen (Wu et al. 2003). In Prostata-Tumoren resultierte entsprechend die Inhibition der CD44-Varianten V7-V10 in einer Stimulation der

Invasion und Migration (Yang et al. 2009). Sowohl CD44 V5 wie auch V7-V10 wurden in der vorliegenden Studie durch VPA und IFN-alpha erhöht. Parallel konnten anti-adhäsive Effekte detektiert werden. Eine Beteiligung der CD44-Varianten ist aufgrund der vorliegenden Daten wahrscheinlich. Welche CD44-Varianten genau Einfluss auf die invasiven Eigenschaften der NZK-Zellen ausüben bedarf weiterer Klärung.

Als klinisch relevant muss weiterhin der Einfluss der CD44-Varianten auf Wachstumsprozesse angesehen werden. In einer Studie am primären und metastasierten NZK wurde eine Korrelation zwischen CD44-Zunahme und Progressions-freiem Überleben nachgewiesen (Lim et al. 2008). Weitere Untersuchungen konnten belegen, dass CD44 die Proliferation hemmt und diese Inhibition mit einem Zellzyklusarrest in der G1/G0-Phase und einer gesteigerten p27-Expression einhergeht (Kathapalli et al. 2007). Tatsächlich wurden in Caki-1 Zellen derartige Effekte beobachtet. Eine Beteiligung der CD44-Varianten an der Proliferations-Hemmung der NZK-Zellen wäre daher ebenfalls denkbar. Die anti-proliferativen Effekte könnten dabei auch über die Bindung an das Aktin-Zytoskelett induziert worden sein (Morrison et al. 2001). Wichtiges Bindeglied zwischen CD44 und dem Aktin-Zytoskelett ist das *Linker*-Protein Merlin (Okada et al. 2009). Merlin, ein Tumorsuppressor, bindet in dephosphorylierter Form CD44. Die Bildung des CD44-Merlin-Komplexes resultiert dabei in einer Proliferations-Hemmung (Morrison et al. 2001). Merlin inhibiert ferner den PI3K/Akt-Signalweg und wird selbst wiederum durch Akt phosphoryliert (Okada et al. 2009). Durch Akt phosphoryliertes und nicht an CD44 gebundenes Merlin kann in der Plasmamembran aggregieren und die Zellmigration induzieren. Es wäre demnach denkbar, dass CD44 über Merlin und das Aktin-Zytoskelett eine duale Wirkung ausübt und sowohl die Adhäsion, als auch die Proliferation der Tumorzellen beeinflusst. Inwieweit CD44 im NZK tatsächlich mit Merlin und dem Aktin-Zytoskelett interagiert, ist bisher rein spekulativ, könnte jedoch neue Ansätze für die Aufklärung der therapeutischen Bedeutung von VPA und IFN-alpha bieten.

5.3 HDAC-Inhibition mittels VPA - Wirkungsverstärkung durch IFN-alpha

VPA wird zu den HDAC-Inhibitoren gezählt. Die HDAC-Aktivität wurde in der vorliegenden Arbeit durch VPA wie erwartet signifikant gehemmt. Zusätzlich konnte die Expression insbesondere von HDAC3 und moderater von HDAC4 in Caki-1 Zellen reduziert werden. Die HDAC-Inhibition korrelierte dabei mit einer deutlichen Erhöhung an acetyliertem Histon H3 und H4. Die Acetylierung der Histone hielt im Vergleich zu der HDAC-Inhibition länger an. Eine Hyperacetylierung dieser Histone konnte nach Gabe von VPA und anderen HDAC-Inhibitoren auch in weiteren Untersuchungen beobachtet werden (z. B. Zubia et al. 2009, Wedel et al. 2008, Atmaca et al. 2007, Kuljaca et al. 2007). Die Histone H3 und H4 sind relevante Bestandteile der Kernkomplexe von Nukleosomen. Ihre Modifikation hat entscheidenden Einfluss auf die DNA-Konformation und Transkription während der Tumorgenese (Popova et al. 2009, Lennartsson et al. 2009). Der inhibitorische Effekt von VPA auf die HDACs und die damit einhergehende Acetylierung der Histone H3 und H4 wurden durch IFN-alpha weiter verstärkt. Die Einzelapplikation mit IFN-alpha resultierte hingegen in keiner HDAC- oder Histon-Modifikation. VPA und die korrespondierende Kombination mit IFN-alpha dürften somit entscheidend auf die Gentranskription einwirken.

Mittlerweile ist bekannt, dass HDAC-Inhibitoren die Hyperacetylierung weiterer Proteine, meist Transkriptionsfaktoren wie p53, in Tumoren induzieren können (z. B. de la Cruz-Hernandez et al. 2007). Nach Untersuchungen an Kolonkarzinomzellen mit Butyrat wurde hypothetisiert, dass die beobachtete Reduktion von FAK und pFAK nicht über die Acetylierung der Histone erfolgt, sondern über eine HDAC-unabhängige Aktivität (Lee et al. 2005). Inwieweit außer den Histonen andere Proteine im NZK durch VPA HDAC-unabhängig verändert wurden, bleibt spekulativ. Die oben genannten Daten lassen jedoch auf eine deutliche Beeinflussung des HDAC-Systems und eine damit verbundene Veränderungen des malignen Verhaltens der NZK-Zellen schließen.

5.4 Veränderung der Expression weiterer Onkoproteine durch VPA und IFN-alpha

Die Expression der Protoonkogene c-myc, JNK, pErk1/2, Akt, pAkt und PPAR γ wurde durch VPA gehemmt, die des Tumorsuppressors p73 erhöht. Die Kombination mit IFN-alpha induzierte in der Regel eine weitere Verstärkung der Effekte. Die Einzelapplikation mit IFN-alpha rief dabei, mit Ausnahme bei JNK nach 3 Tagen und pErk1/2, keine Wirkung hervor.

c-myc ist in die Proliferation, den Zellzyklusarrest und die Apoptose involviert. Es spielt eine entscheidende Rolle bei der Regulation der p21-Expression. Dabei bindet c-myc an den p21-Promoter und blockiert so dessen Transkription. In verschiedenen Tumorentitäten konnten HDAC-Inhibitoren durch die Reduktion von c-myc eine p53-unabhängige Expression von p21 induzieren (Tang et al. 2009, Wang et al. 2008, Li et al. 2004). Diese korrelierte mit einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase (Rohan et al. 2009, Tang et al. 2009, Wang et al. 2008). Dieser p53-unabhängige Mechanismus würde die anti-proliferativen Effekte trotz unveränderten p53 erklären, die wir in den NZK-Zellen nach VPA- und IFN-alpha-Behandlung hatten beobachten können.

Die MAP-Kinasen Erk1/2, JNK und p38 werden durch Phosphorylierung aktiviert. Im klarzelligen NZK-Gewebe wurde gegenüber normalem Nierengewebe eine signifikant erhöhte pErk1/2-Expression detektiert (Lee et al. 2009). Erk ist im NZK über den Raf/MEK/Erk-Signalweg maßgeblich in die Proliferation und Apoptose-Inhibition involviert (Stahler et al. 2005, Stadler et al. 2005). Neuste Untersuchungen konnten belegen, dass aktive Kaliumkanäle über eine Aktivierung von Erk die Proliferation in Gliomzellen in vitro und in vivo induzieren (Huang et al. 2009). Des Weiteren bedingt, neben der FAK-Phosphorylierung, die Signaltransduktion durch Erk die Integrin-abhängige Adhäsion an EZM-Proteine von ovarialen (Hapke et al. 2003), Kolon- (Sawhney et al. 2006) und Pankreastumorzellen (Sawai et al. 2005). Im Zusammenspiel mit JNK wirkt Erk1/2 auf die Adhäsion von NZK-Zellen ein (Jones et al. 2007a).

JNK ist zudem in die Regulation der Apoptose, Proliferation und Migration involviert. In Tumorzellen der Brust korrelierte die Proliferation und Migration mit erhöhter Phosphorylierung von JNK, Erk1/2 und Akt (Fu et al. 2009, McMurtry et al. 2008). JNK wurde dabei als Schlüsselprotein der Invasion dieser Tumorzellen identifiziert (McMurtry et al. 2008). Im NZK wurde JNK mit der Apoptose und Adhäsion in Ver-

bindung gebracht. Dabei ging ein Phosphorylierung des JNK mit pro-adhäsiven (Jones et al. 2007a) aber pro-apoptotischen (z.B. Ou et al. 2007, Mizuno et al. 2004) Effekten einher. In der vorliegenden Studie war keine Apoptose in den NZK-Zellen detektierbar, was mit der fehlenden Phosphorylierung der JNK im Einklang steht.

Aufgrund ihrer Bedeutung für die Tumorzellen lässt sich daher schließen, dass die Beeinflussung der MAP-Kinasen einen Weg darstellt, über den VPA seine anti-tumorale Wirkung entfaltet.

Die Aktivierung des PI3K/Akt-Signalwegs ist eng mit der Tumorgenese und -progression assoziiert (Merseburger et al. 2008). So reguliert der PI3K/Akt/mTOR-Signalweg neben dem Ras/Raf/MAPK-Signalweg die Aktivität des HIF-1 α , welches maßgeblich die Transkription verschiedener Wachstumsfaktoren und Rezeptoren induziert (Kim et al. 2004, Kamura et al. 2000, Herman et al. 1994, Latif et al. 1993). pAkt gilt als potentieller Prognosefaktor. Eine erhöhte pAkt-Expression konnte in hochgradigen NZK mit geringer Überlebensrate (Hager et al. 2008, Merseburger et al. 2008) sowie in weiteren immun- und chemoresistenten Tumoren detektiert werden (Noh et al. 2008, Nicholson et al. 2002). Eine Hemmung der Akt-Aktivität führte hingegen zu einer Immunerkennung durch T-Zellen (Noh et al. 2008). Der PI3K/Akt-Signalweg ist somit maßgeblich in die Umgehung der Immunerkennung von Tumorzellen involviert. Die durch VPA bedingte Verminderung des Akt-Gehalts bzw. -Aktivität könnte somit womöglich die Detektion der Tumorzellen durch Immunzellen wiederherstellen.

Auch die Überexpression von PPAR γ korreliert mit Tumorgenese und -progression. In ovarialen Karzinomen war eine erhöhte PPAR γ -Expression mit Chemoresistenz und einem schlechten Gesamtüberleben assoziiert (Davidson et al. 2009). In Karzinomen des Pankreas resultierte die PPAR γ -Hemmung in verringerter Zellmotilität in vitro und reduzierter Metastasierung in vivo (Nakajima et al. 2008). Weitere Untersuchungen zeigten eine Korrelation zwischen HDAC- und PPAR γ -Aktivität, in der offensichtlich die Acetylierung des Histon H3 eine Rolle spielt (Fu et al. 2005). HDAC-Inhibitoren konnten in Prostatatumoren PPAR γ hemmen und in Kombination mit einem PPAR γ -Antagonisten die Proliferation und Invasion in vivo inhibieren (Annicotte et al. 2007). Die bisherigen Beobachtungen legen nahe, dass die durch VPA und IFN-alpha verringerte PPAR γ -Expression an der Reduktion der Proliferation und Adhäsion von NZK-Zellen beteiligt sein könnte.

Die p73-Expression wurde durch VPA erhöht. Die zusätzliche Applikation mit IFN-alpha induzierte nach 3 Tagen eine weitere Expressions-Stimulation. p73 ist ein strukturelles Homolog des Tumorsuppressors p53. p73 kann über p53-Promotoren einen Zellzyklusarrest oder die Apoptose einleiten und wird negativ durch Akt beeinflusst (Lapi et al. 2008, Lu et al. 2008). Seine exakte Bedeutung wird noch diskutiert. Talos et al. postulierte, dass p73 nur in Abwesenheit von p53 aktiv wird (Talos et al. 2007). Hingegen gehen neuere Überlegungen davon aus, dass p73 und p53 gleichermaßen eine Tumorsuppression induzieren, aber unterschiedlich und während verschiedener Stadien der Tumorgenese aktiviert werden (Beitzinger et al. 2008, Rosenbluth et al. 2008). Dies könnte erklären, warum VPA den p73-Gehalt in Caki-1 Zellen erhöhte, die vorhandene Expression von p53 jedoch nicht beeinflusste. Auch in resistenten ovarialen Tumoren korrelierten durch den HDAC-Inhibitor TSA ausgelöste anti-neoplastischen Effekte mit einer erhöhten p73-, nicht aber p53-Expression (Muscolini et al. 2008).

Die Signalproteine PTEN und p38 MAPK wurden durch VPA und IFN-alpha nicht moduliert. Beide Proteine sind mit Apoptose und Hemmung des Zellwachstums assoziiert (Hager et al. 2008, Merseburger et al. 2008, Shin Lee 2003, Xia et al. 1995). Tatsächlich konnte in der vorliegenden Arbeit zu den untersuchten Zeitpunkten keine Apoptose-Induktion beobachtet werden. Somit wäre eine Kausalität zwischen der unveränderten Expression von PTEN und p38 MAPK sowie dem Mangel an apoptotischen Zellen denkbar. Des Weiteren lässt sich daraus schließen, dass die Proliferation über andere Proteine als PTEN und p38 MAPK inhibiert wird.

5.5 Durch VPA und IFN-alpha alterierte Genexpressionsprofile

Da VPA als HDAC-Inhibitor initial epigenetische Modulationen induziert, ist die Detektion von Veränderungen im Genexpressionsprofil nach entsprechender Behandlung von besonderem Interesse. Mittels *Microarray*-Analyse und *RT qPCR* konnten somit tiefere Einblicke in die Wirkungsweise von VPA als auch der Kombination mit IFN-alpha gewonnen und die den funktionellen Alterationen zugrunde liegenden molekularen Mechanismen evaluiert werden.

VPA und IFN-alpha resultierten in einer signifikanten Modulation des Genexpressionsprofils von NZK-Zellen. Bemerkenswerterweise unterstützt IFN-alpha nicht nur VPA-spezifische Mechanismen, sondern induziert trotz geringer Dosis eigene Effekte. Die Modifikation der Expression war von der Behandlungsart (Mono-/Kombinationstherapie) und Behandlungszeit abhängig. VPA 1 mM induzierte deutlichere Effekte als VPA 0,25 mM. IFN-alphas modulatorische Wirkung auf die Expression nahm mit zunehmender Inkubationszeit stark ab. Hingegen resultierte die Kombination von VPA und IFN-alpha in Abhängigkeit von der VPA-Dosis in einer weiteren Modulation der Genexpression, die nach 5 Tagen am ausgeprägtesten war. Dabei handelte es sich nicht ausschließlich um eine additive Wirkung der Einzelkomponenten auf die Genexpression. Vielmehr induzierte die Kombination zusätzlich eine Modulation neuer Gene, die unter Monotherapie nicht beeinflusst worden waren. Die Effekte von IFN-alpha konnten dabei durchaus denen von VPA entgegenlaufen, wie auch umgekehrt VPA z. T. IFN-alpha entgegenwirkte. IFN-alpha entfaltet seine Wirkung vor allem nach 12-stündiger, VPA nach 3- und 5-tägiger Behandlung. Daraus lässt sich schließen, dass IFN-alpha schnelle und VPA langsamere Effekte über das HDAC-System induziert. Denkbar wäre ferner, dass IFN-alpha eine kürzere Halbwertszeit aufweist als VPA, wogegen jedoch der anhaltende anti-tumorale Einfluss des Kombinationsregimes spricht.

Die nachfolgende Diskussion konzentriert sich auf prinzipielle Wirkmechanismen und Veränderungen relevanter Proliferations- und Adhäsionsgene. Die detaillierte Analyse ist dem Anhang (Punkt 8) zu entnehmen.

Der dominante Einfluss von IFN-alpha nach 12-stündiger Applikation war besonders auffällig in der Modulation des Chemokin-Signalwegs, die in der 89-fachen bzw. 79-fachen Expressionssteigerung von CXCL11 und CXCL10 ihr Maximum erreichten. Mit zunehmender Inkubationszeit nahm die Wirkung von IFN-alpha stark

ab. Hinzu kam, dass VPA diesen stimulierenden Effekt entgegenwirkte, so dass die Erhöhung der Chemokinexpression bereits nach 3 Tagen aufgehoben bzw. invertiert wurde. Diese Ergebnisse wurden mittels *RT qPCR* verifiziert. Chemokine sind chemotaktisch wirkende Zytokine, die in die Immunabwehr und Angiogenese involviert sind. Relevante Chemokine, die durch IFN induziert werden sind CXCL11, CXCL10 und CXCL9. Sie sind wichtige Faktoren der biologischen Effekte des IFN (Kaur et al. 2008), verantwortlich für die Chemotaxis von T- und natürlichen Killerzellen sowie für die Anregung der Proliferation von Lymphozyten (Whiting et al. 2004, Johnston et al. 2003). Chemokine induzieren die Integrin-abhängige Adhäsion an Endothel, die Motilität und transendotheliale Migration immunologischer Zellen (Miles et al. 2008). Die Immuntherapie mit Interleukin-2 resultierte im NZK in erhöhten Plasmalevel von CXCL11, CXCL10 und CXCL9, welches mit einer Reduktion angiogener Effekte einherging (Reckamp et al. 2007). In kolorektalen Karzinomen wurden CXCL11 und CXCL10 mit dem Guanylat Bindeprotein-1 (GBP1) koexprimiert (Naschberger et al. 2008). GBP1 wurde in diesem Zusammenhang als Biomarker der Immunantwort angesehen. Eine verminderte GBP1-Expression ist bei Lungentumoren ferner mit Angiogenese assoziiert (Xu et al. 2008). Auch in den hier untersuchten NZK-Zellen korrelierte die gesteigerte CXCL11- und CXCL10-Expression mit der Koexpression von GBP1. Aufgrund der Ergebnisse schließen wir, dass IFN-alpha zunächst eine Angiogenese-Inhibition induziert und die körpereigene Abwehr aktiviert. Da ein chronischer inflammatorischer Zustand jedoch zur konstitutiven Aktivierung pro-tumoraler Gene und Proteine führt (Richmond et al. 2004), ist die zunehmende Chemokin-Hemmung, auch durch VPA, als positiv zu bewerten. Möglicherweise werden hier negative Rückkopplungsschleifen induziert, die diesen unerwünschten Nebeneffekten des IFN-alpha entgegenwirken. Inwieweit sich diese Hypothese physiologisch tatsächlich bestätigen lässt, müsste in vivo näher evaluiert werden.

Neben der Expression von Chemokinen waren ferner Gene des IFN-Signalwegs unter IFN-alpha signifikant erhöht. Insbesondere die Expression des IFN-regulierten Faktor 7 (IRF7) und IFN-stimulierten Gen 15 (*Ubiquitin-like*, ISG15) wurde in Caki-1 Zellen zu allen Zeitpunkten signifikant durch IFN-alpha und die korrespondierenden Kombinationen mit VPA erhöht. ISG15 zeigte durch die Kombination mit VPA eine weitere Expressionssteigerung, wobei VPA allein keine Wirkung erzielte. Auch IRF7 und ISG15 beeinflussen die biologische Funktion des IFN (Kaur et al. 2008). In verschiedenen Tumorentitäten konnte eine Kausalität zwischen epigenetisch bedingter Promotermodulation und verminderter IRF7-Expression evaluiert werden

(Jee et al. 2009, Kumagai et al. 2009). IRF7 spielt eine entscheidende Rolle bei der Seneszenz-Induktion bzw. Proliferations-Inhibition (Li et al. 2008). Die Funktion von ISG15 in Tumoren ist umstritten. Die Deregulation des Ubiquitin-Proteasom-Systems ist in vielfältige Erkrankungen, inklusive Tumorerkrankungen, involviert (Goldenberg et al. 2008). Untersuchungen zeigten eine erhöhte ISG15-Expression in unterschiedlichen Tumoren, in denen es dem Ubiquitin-Signalweg entgegenwirkt (Desai et al. 2008). In epithelialen Nierenzellen hingegen konnte eine Ubiquitin-ähnliche Aktivität des ISG15 nachgewiesen werden (Tanabe et al. 2008). In Lungenkarzinomen korrelierte eine Aktivierung des ISG15 mit einer Hemmung der Proliferation (Feng et al. 2008). Eine durch VPA und IFN-alpha induzierte anti-proliferative Aktivität des ISG15 im NZK ist daher wahrscheinlich.

VPA entfaltete seine Wirkung vor allem nach längerer Behandlungszeit (3 und 5 Tage). So nahm die Expression der Integrine $\alpha 2$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 6$ und $\alpha 7$ kodierenden Gene durch die Applikation mit VPA stetig zu. Insbesondere die Expression des Integrin $\alpha 7$ Genes wurde signifikant erhöht. Die Kombination mit IFN-alpha resultierte in einer weiteren Transkriptzunahme. Die *RT qPCR*-Daten verifizierten diese Beobachtungen. $\alpha 7\beta 1$ wurde initial in der Skelett- und Gefäßmuskulatur als Lamininrezeptor identifiziert (Song et al. 1992). Untersuchungen demonstrierten, dass ein $\alpha 7$ -Verlust in vaskulären Muskelzellen zu Hyperplasien und veränderter Expression weiterer Integrin α -Subtypen führte (Flintoff-Dye et al. 2005), z.B. zur Reduktion von Integrin $\alpha 5$ (Welser et al. 2007). Eine verminderte $\alpha 5$ -Expression ist, wie oben erwähnt, kennzeichnend für hochgradig maligne NZK und korreliert mit einer verstärkten Tumormigration (Jones et al. 2007, Markovic-Lipkovski et al. 2001). Tatsächlich ging die Stimulation des Integrin $\alpha 7$ in Caki-1 Zellen mit einer Verdopplung der $\alpha 5$ -Expression einher (5 Tage VPA-Inkubation). Des Weiteren konnte $\alpha 7\beta 1$ über eine Erk-Inhibition die Differenzierung und Proliferations-Hemmung von vaskulären Muskelzellen induzieren (Welser et al. 2007a). $\alpha 7$ nimmt damit in den vaskulären Muskelzellen eine wichtige Rolle als Teil des inhibierenden Signalkomplexes der Proliferation ein und ist offensichtlich in die Differenzierung involviert. Welche Funktion $\alpha 7$ in NZK-Zellen übernimmt, ist bisher nicht bekannt. Die Erk1/2- und Proliferations-Inhibition sowie die $\alpha 5$ -Stimulation lassen eine Einbindung von $\alpha 7$ in die durch VPA-bedingten anti-proliferativen und -migratorischen Effekte vermuten. Vielleicht handelt es sich bei $\alpha 7$ um ein entscheidendes, bisher noch nicht erkanntes Schlüsselprotein der Tumorgenese.

Zeit-abhängig konnten signifikante Expressionssteigerungen von Genen beobachtet werden, die allgemein als Mediatoren der Tumorprogression angesehen werden. So der des Chemokinrezeptors CXCR4 und der Adhäsionsmoleküle NCAM1 bzw. ICAM1 nach 12 Stunden. Ähnliche Daten wurden in der *RT qPCR* gewonnen. CXCR4, NCAM1 und ICAM1 sind u. a. in die Invasion von NZK involviert (Jones et al. 2007a, Andreadis et al. 2007). Die Produkte dieser Transkripte könnten den anti-invasiven Effekten entgegenwirken. Das würde erklären, warum die durch VPA und IFN-alpha induzierte Inhibition der Proliferation insgesamt stärker ausgeprägt war als die der Adhäsion. Andere Daten belegen jedoch, dass CXCR4 und ICAM1 neben der Tumormetastasierung ferner in die Immunabwehr von Tumorzellen involviert sind (Viey et al. 2008, Tanabe et al. 1997). Neuere Studien konnten zeigen, dass Tumor-infiltrierende T-Zellen über die CXCL12/CXCR4-Interaktion effizient primäre NZK-Zellen detektieren können (Viey et al. 2008). Weiterhin ist bekannt, dass ICAM1 an Lymphozyten Funktions-assoziierte Antigene (LFA) bindet (Perut et al. 2009) und damit eine entscheidende Rolle bei der Erkennung und Vernichtung der Tumorzellen durch Lymphozyten spielt (Wu et al. 2007). Tatsächlich potenziert die LFA/ICAM1-Bindung die Lyse von NZK-Zellen (Gati et al. 2004). D. h. eine Einbindung der erhöhten CXCR4- und ICAM1-Expression in die Tumorerkennung durch das Immunsystem wäre vorstellbar. Die gleichzeitige Expressionserhöhung mit den zuvor genannten Chemokinen scheint diese Hypothese zu bestätigen. Inwieweit CXCR4 und ICAM1 tatsächlich in diese physiologischen Vorgänge involviert sind, bedarf weiterer Klärung.

Die Expressionssteigerung einiger Gene wurde ausschließlich durch die Kombination von VPA und IFN-alpha ausgelöst. So die Expression des *major histocompatibility complex class II* (MHC, hier: HLA-DPA1 und –DPB1). HLAs sind Teil des Immunsystems. In Melanomzellen konnte nach HDAC-Inhibition eine verstärkte Expression von HLAs beobachtet werden, die mit einer Proliferations-Hemmung durch Apoptose-Induktion korrelierte (Khan et al. 2007). Die epigenetische Aktivierung der Immungene resultierte dabei in der Transformation der Tumorzellen zu Antigen-präsentierenden Zellen. Ein ähnlicher Effekt ist für die NZK-Zellen denkbar, der jedoch erst durch die additive Applikation mit IFN-alpha signifikant wird.

Des Weiteren induzierte VPA und die korrespondierende Kombination mit IFN-alpha eine verstärkte Expression negativer Regulatoren des Wnt/ β -Catenin-Signalwegs. Beispielhaft seien Dapper (DACT3) und das Kringel-enthaltende Transmembranprotein 2 (KREMEN2) genannt. Der Wnt/ β -Catenin-Signalweg ist in Proliferation, Migration und Differenzierung von Zellen involviert (Gao et al. 2008). Tatsächlich war die erhöhte DACT3- und KREMEN2-Expression mit einer Reduktion des Wnt3 assoziiert. Wnt3 ist eine entscheidende Komponente des Wnt-Signalweges in der Pathogenese u. a. von Hepatozyten und Mantelzell-Lymphomen (Bengochea et al. 2008, Gelebart et al. 2008) und korreliert mit geringem Differenzierungsgrad (Bengochea et al. 2008, Katoh et al. 2008). Untersuchungen gehen zudem davon aus, dass DACT3 eine Hemmung des HDAC1 induzieren kann (Gao et al. 2008). Hypothetisch könnten DACT3 und KREMEN2 demnach die Redifferenzierung der NZK-Zellen induzieren und DACT3 durch seinen inhibitorischen Effekt auf HDAC1 die modulatorische Wirkung von VPA weiter verstärken.

Insbesondere nach anhaltender Behandlungszeit (3 und 5 Tagen) zeigten sich neben den stimulatorischen distinkte inhibitorische Effekte. Die verzögerte Expressions-Inhibition lässt dabei einen indirekten Applikationseffekt vermuten, der von primären VPA- bzw. IFN-alpha-Zielstrukturen ausgelöst wurde.

So induzierte VPA 1 mM eine signifikante Reduktion der VCAM1- und Survivin (BIRC5)-Transkripte. Die Kombination mit IFN-alpha verstärkte die inhibitorischen Effekte in der Regel weiter. IFN-alpha allein zeigte dabei keine Wirkung. Die *RT qPCR* verifizierte die VCAM1-Daten. Fortgeschrittene NZK exprimieren verstärkt VCAM1 (Lin et al. 2007). Hinweise deuten darauf hin, dass diese erhöhte Expression einen Mechanismus induziert, der es den NZK-Zellen erlaubt, der Immunabwehr zu entgehen und Resistenzen auszubilden (Lin et al. 2007). Survivin ist in die mitotische Deregulation von Gallenwegstumoren involviert, welche in höherem Tumorgrad und verschlechterter Überlebensrate der Patienten resultiert (Shen et al 2009). Survivin wird durch Cdk1 phosphoryliert, wodurch es seine anti-apoptotische Wirkung entfaltet (Barrett et al. 2009). VCAM1 und Survivin sind damit wichtige Prognosefaktoren, die durch VPA und IFN-alpha signifikant inhibiert werden.

Weiterhin induzierte VPA und die Kombination mit IFN-alpha eine signifikante Reduktion in Nährstoffaufnahme und Bildung von Chemoresistenzen involvierter

Gene. So wurde die Expression von Claudin-2 (CLDN2), Ceruloplasmin (CP, Ferrooxidase) und dem Kernprotein-1 (NUPR1) inhibiert. Sie werden in neoplastischen Erkrankungen, inklusive dem NZK, verstärkt exprimiert und konnten sowohl im Gewebe, als auch im Serum von Tumorpatienten detektiert werden (Chowdhury et al. 2009, Nemeth et al. 2009, Kotrikadze et al. 2008, Sardana et al. 2008, Tye et al. 2008, Weber et al. 2008, Simon et al. 2007, Xin et al. 2007, Luo et al. 2006, Hough et al. 2001, Stassar et al. 2001, Manjula et al. 1992, Kunapuli et al. 1987).

Claudine sind integrale Komponenten der Tight Junctions, die eine entscheidende Rolle bei der Permeabilität, Proliferation und Differenzierung übernehmen (Nemeth et al. 2009, Peter et al. 2008, Weber et al. 2008). In den proximalen Tuben der Niere partizipiert Claudin-2 an der Resorption (Kiuchi-Saishin et al. 2002). Eine verminderte Claudin-2-Expression resultiert demnach in einer reduzierten Stoffaufnahme. Tumorzellen haben aufgrund ihrer erhöhten Stoffwechselaktivität einen größeren Bedarf an Nährstoffen. Eine Reduktion der Stoffzufuhr, bedingt durch eine verminderte Resorption, würde somit ihrer neoplastischen Aktivität entgegen wirken. Die Hemmung der Expression von Ceruloplasmin (CP) könnte eine ähnliche Wirkung auf die Tumorzellen haben. So benötigen neoplastische Zellen auch viel Eisen (Fe^{3+}). CP ist eine Ferrooxidase, die in den Elektronentransport von Eisen Fe^{2+} (toxisch) zu Fe^{3+} (nicht toxisch) involviert ist. In Tumorzellen ist der Anteil an Transferrinrezeptoren und die Eiseninternalisation wesentlich erhöht (Kwok et al. 2002). Die Reduktion von Eisen (Fe^{3+}) resultiert in einem Zellzyklusarrest in der G1-Phase und damit in einer Inhibition der Proliferation (Elstner et al. 2007, Kwok et al. 2002). Eine Beteiligung der signifikanten reduzierten CP-Expression an der gemessenen Proliferations-Hemmung wäre daher denkbar. Weitere Studien konnten zeigen, dass CP besonders in malignen Tumorzellen erhöht ist, die Chemo- und Radiotherapie-resistent sind (Tye et al. 2008). Eine Korrelation zwischen HIF-1 α - und CP-Expression scheint dabei eine Rolle zu spielen. HIF-1 α induziert offensichtlich die Expression von Transportern, die eine Chemo- und Radioresistenz ermöglichen (Keith et al. 2007, Irie et al. 2004, Comerford et al. 2002). Auch das Kernprotein NUPR1 ist an der Entstehung von Chemoresistenzen beteiligt (Chowdhury et al. 2009). CP und NUPR1 könnten damit Teil eines Mechanismus sein, über den VPA Resistenzen revertiert.

Abschließend sollte angemerkt werden, dass die veränderten Genexpressionsprofile keinen tatsächlichen Aufschluss über die translationale Umsetzung der Transkripte geben. Inwieweit die Veränderungen auf der Genebene somit Einfluss auf das Proteinprofil nehmen und welche Effekte die Behandlung auf deren Aktivität und intrazelluläre Verteilung hat, bleibt spekulativ. Umso relevanter sind die Daten der vorgenannten funktionellen Untersuchungen. Diese belegen, dass sowohl die Veränderungen des Gen- als auch des Proteinexpressionsprofils insgesamt mit einer reduzierten Proliferation und Adhäsion der NZK-Zellen korreliert.

5.6 VPA vermindert das Tumolvolumen und verändert die Proteinexpression in vivo

VPA induzierte in Caki-1 xenogen transplantierten Nacktmäusen eine signifikante Inhibition des Tumolvolumens gegenüber den unbehandelten Kontrollen. Ähnliche Wachstums-hemmende Effekte konnten nach VPA-Behandlung in tierexperimentellen Studien mit Tumorzellen der Prostata, Gebärmutter, Ovarien, Blase und des Knochenmarks beobachtet werden (Chen et al. 2006, Xia et al. 2006, Li et al. 2005, Takai et al. 2004, 2004a). In der hier präsentierten Studie wurde dabei erstmals zwischen Tag 10 und 20 einer Zunahme des Tumolvolumens entgegen gesteuert. Mit fortschreitender Behandlungsdauer zeigte diese Hemmung Signifikanz. In vivo scheint somit eine lang anhaltende VPA-Gabe noch entscheidender als in vitro. In guter Übereinstimmung mit unserer Beobachtung haben frühere Untersuchungen gezeigt, dass VPA erst nach chronischer Applikation seine biologische Wirkung in vivo entfaltet (Xia et al. 2006). Die durch VPA bedingte verminderte Volumenzunahme im Mausmodell war mit einer deutlich erhöhten p21- und Bax-Expression assoziiert. Des Weiteren konnte eine verstärkte Expression von Cyclin D3 und Rb sowie eine Reduktion von Cdk1 nachgewiesen werden. Die genannten Zellzyklusproteine nehmen, wie oben erwähnt, erheblichen Einfluss auf die Proliferation und dürften entscheidend in die signifikante Hemmung des Tumorstwachstums involviert gewesen sein. Bax als pro-apoptotisches Protein könnte diesen Effekt noch verstärkt haben. So korrelierte u. a. in Schilddrüsentumoren eine durch VPA induzierte Proliferations-Hemmung mit einer Erhöhung von Bax (Shen et al. 2005). Die additive Gabe von IFN-alpha bewirkte eine zusätzliche Reduktion von Bcl-2, HDAC3 und Cdk4. Die Kombination induzierte ebenfalls eine signifikante Wachstums-Inhibition, die im Vergleich zur VPA-Monotherapie jedoch keine weitere Wirkungssteigerung erzielte. Die p21-Expression wurde in diesem Zusammenhang überraschenderweise vollständig blockiert. Der Einfluss von VPA auf p21 könnte dabei von der initialen p21-Expression abhängig sein. Ein ähnliches Phänomen war

in einer Studie mit Brust-, Lungen-, Prostata- und Kolonkarzinomzellen beobachtet worden (Kuljaca et al. 2007). Das Vorhandensein einer basalen p21-Expression assoziierte dort mit verringerter Ansprechrate gegenüber dem HDAC-Inhibitor TSA und IFN-alpha. Auch in den vorliegenden Untersuchungen war bereits in den unbehandelten Tumorzellen eine p21-Expression detektierbar. Eine Kausalität zwischen dieser und der unerwarteten Blockade des p21 nach Kombinationsbehandlung liegt daher nahe.

Beim Vergleich der *in vitro* und *in vivo* Daten ist zu beachten, dass die Behandlungsregime voneinander differierten. *In vivo* erfolgte die Applikation von VPA und IFN-alpha zeitlich nachgeschaltet, wohingegen im Zellkulturmodell die Agenzien gleichzeitig verabreicht wurden. Eine Studie an Tumorzellen der Brust konnte zeigen, dass die gleichzeitige Applikation mit Natrium-Butyrat und IFN-alpha eine signifikante Steigerung der anti-proliferativen Effekte von IFN-alpha induzierte. Hingegen resultierte die zeitlich versetzte Kombinationsbehandlung in keiner zusätzlichen Proliferations-Hemmung gegenüber den Einzelapplikationen (Biffi et al. 1998). Weiterhin erfolgte die Behandlung der Zellkulturen nur einmalig, wohingegen die Tiermodelle eine chronische Applikation über einen wesentlich längeren Zeitraum erhielten. Es ist davon auszugehen, dass sich daher die Metabolisierung der Agenzien in den Modellen voneinander unterschied. Zudem fanden *in vitro* und *in vivo* andere Konzentrationen Verwendung, was zur Folge hatte, dass *in vivo* IFN-alpha allein moderate inhibierende Effekte auf das Tumorzellvolumen ausübte. *In vitro* war kein derartiger Einfluss von IFN-alpha detektierbar.

5.7 Schlussfolgerung und Ausblick

Der HDAC-Inhibitor VPA hat sich in der vorliegenden Studie als potente anti-tumorale Substanz beim NZK erwiesen, die über die Modulationen der Gen-expression und relevanter regulatorischer Proteine eine anti-proliferative und -adhäsive Aktivität in vitro und Wachstums-inhibierende Effekte in vivo induzierte. In Abbildung 27 sind die im Rahmen dieser Arbeit gewonnenen Ergebnisse nochmals zusammengefasst und vereinfacht dargestellt (Abb. 27).

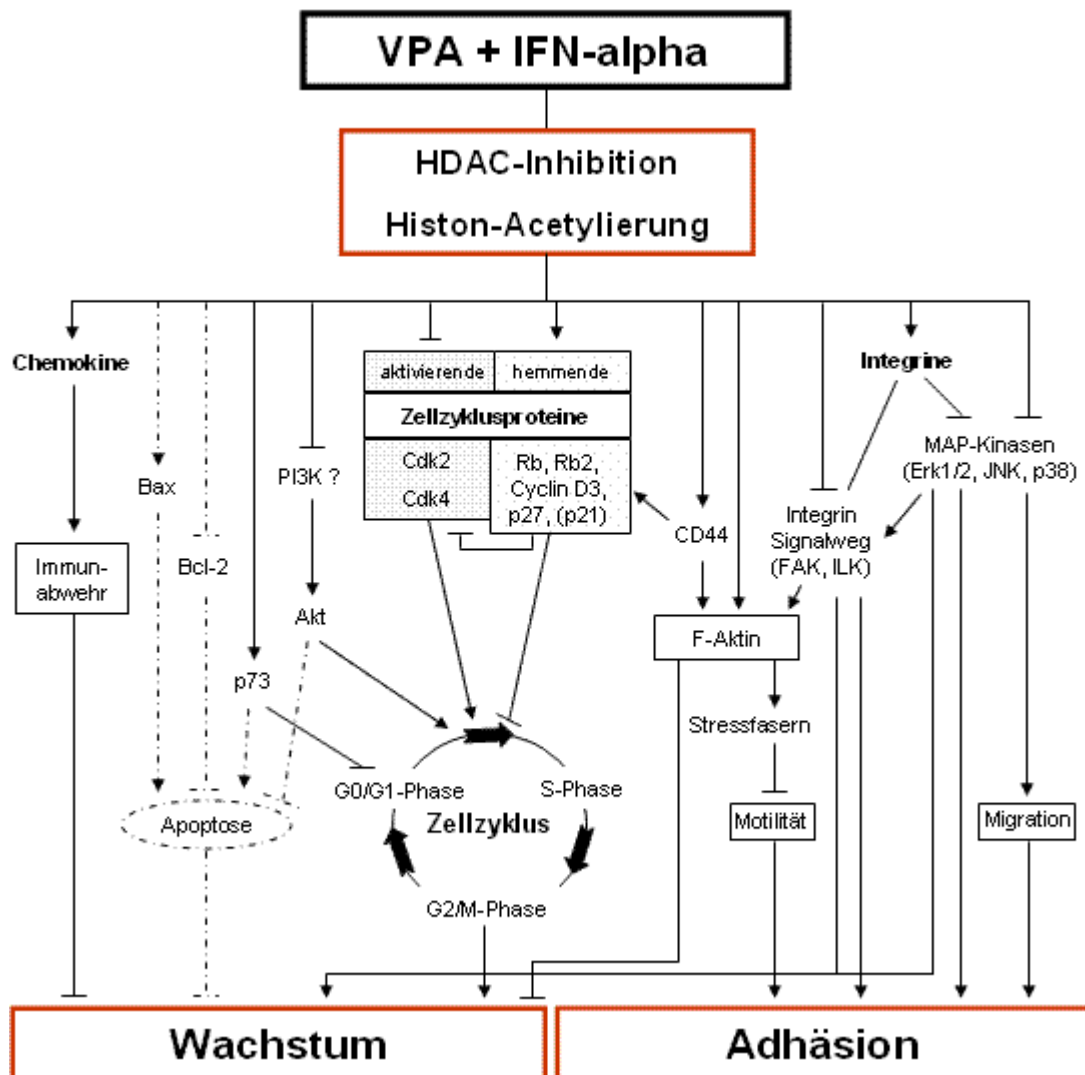


Abbildung 27: Skizzierte Übersicht der Wirkmechanismen einer VPA- und VPA/IFN-alpha-Behandlung. Darstellung aktivierender (→) und hemmender Effekte (⊣) auf die molekularen und funktionellen Eigenschaften der NZK-Zellen. Gestrichelte Darstellung: Phänomene, die in vitro nicht messbar waren.

Basierend auf dem in vitro Modell resultierte die additive Gabe von IFN-alpha in einer Wirkungsverstärkung dieser anti-tumoralen Eigenschaften. Wir postulieren daher, dass VPA sowie die kombinierte VPA/IFN-alpha-Behandlung für austherapierte NZK-Patienten ein innovatives, viel versprechendes Therapiekonzept darzustellen vermag. Denkbar ist der Einsatz als Erstlinienbehandlung oder die additive Integration in bereits bestehende Therapieregime. Um aus den gewonnenen experimentellen Daten zukünftig eine tragfähige Therapie für die NZK-Behandlung zu konzipieren, sind weitere vertiefende tierexperimentelle Untersuchungen, insbesondere zur Optimierung des Dosierungsprotokolls sowie entsprechende klinische Studien an NZK-Patienten essentiell. Da sowohl VPA als auch IFN-alpha bereits in der Klinik etabliert sind, wäre eine vergleichsweise schnelle therapeutische Umsetzung dieses neuen, hoffnungsvollen Behandlungsansatzes möglich.

6 Zusammenfassung

Das Nierenzellkarzinom (NZK) ist der häufigste maligne Tumor der Niere. In vielen Fällen sind bereits bei der Erstdiagnose Metastasen vorhanden oder entstehen im Verlauf der Therapie. Die Behandlungsmöglichkeiten für diese NZK-Patienten sind äußerst limitiert. Nahezu 2/3 der Betroffenen versterben an ihrer Erkrankung. Die Etablierung neuer Therapieansätze zur Behandlung des NZK ist dringend gefordert. Es wird postuliert, dass ein Therapiekonzept basierend auf dem Histondeacetylase (HDAC)-Inhibitor Valproat (VPA) kombiniert mit niedrig dosiertem Interferon (IFN)-alpha eine innovative und effiziente Behandlungsoption für austerapierte NZK-Patienten eröffnen könnte.

In der vorliegenden Studie wurde der Einfluss einer VPA-Mono- versus VPA/IFN-alpha-Kombinationstherapie auf die malignen Eigenschaften verschiedener NZK-Zelllinien evaluiert. Mittels funktioneller Untersuchungen wurden Proliferations- und Adhäsionsphänomene unter den entsprechenden Therapien näher betrachtet. Fluorimetrische und molekularbiologische Studien dienten der detaillierten Aufklärung der den Veränderungen zugrunde liegenden Wirkmechanismen. Zur translationalen Gestaltung wurden zusätzlich tierexperimentelle Untersuchungen durchgeführt.

VPA induzierte eine signifikante Reduktion der Proliferation von NZK-Zellen, die durch die additive Gabe von IFN-alpha weiter verstärkt wurde. Die anti-proliferativen Effekte korrelierten mit einer Zunahme der Zellen in der G0/G1-Phase und einer damit einhergehenden verminderten Anzahl an Zellen in der S-Phase. Die Verschiebung der Zellzyklusphasen war mit einer deutlichen Modulation relevanter regulatorischer Zellzyklusproteine assoziiert. Des Weiteren resultierte VPA und die korrespondierende Kombination mit IFN-alpha in einer signifikanten Inhibition der Adhäsion an Endothel und die extrazellulären Matrixproteine. VPA und die VPA/IFN-alpha-Kombination übten ihren Einfluss dabei offensichtlich über eine Modulation von Adhäsionsrezeptoren, implizit Integrine und CD44-Varianten, aus. Die anti-proliferative und –adhäsive Wirkung war in der Regel nach längerer Inkubationszeit von 5 Tagen deutlich stärker als nach 3 Tagen. In analog behandelten normalen Nierenzellen zeigten sich im Vergleich keine solchen Effekte. Die Behandlung mit VPA und IFN-alpha scheint somit spezifisch maligne Zellen zu beeinflussen. VPA induzierte in den NZK-Zellen ferner die Reduktion von Protoonkogenen und MAP-Kinasen sowie die Zunahme von Tumorsuppressoren. Die zusätzliche Gabe von IFN-alpha resultierte in einer weiteren Wirkungsverstärkung gegenüber VPA allein. VPA und die Kombination mit IFN-alpha inhibierten zudem signifikant die HDAC-

Aktivität und -Proteinexpression der NZK-Zellen. Diese Hemmung ging mit einer Hyperacetylierung der Histone einher. Die epigenetische Modulation führte zur veränderten Genregulation und Transkription. So nahmen VPA und die korrespondierende Kombination neben den genannten funktionellen und molekularbiologischen Veränderungen maßgeblich Einfluss auf das Genexpressionsprofil der Tumorzellen. Die Expression negativer Regulatoren der Proliferation, Migration und Adhäsion sowie von Genen involviert in Differenzierung und Immunantwort wurden erhöht, wohingegen die Anzahl der Transkripte von Genen mitverantwortlich für die Ausbildung von Resistenzen und die Nährstoffversorgung der Tumoren reduziert wurde. Translationale tierexperimentelle Studien bestätigten die klinische Relevanz der VPA- und VPA/IFN-alpha-Behandlung, die in einer signifikanten Hemmung des Tumorwachstums resultierten. Die Wachstums-Inhibition war mit einer starken Modulation regulatorischer Proteine des Zellzyklus, der Apoptose und des HDAC-Systems assoziiert.

Die vorliegenden Ergebnisse demonstrieren das viel versprechende Wirkungspotential von VPA und der korrespondierenden Kombination mit niedrig dosiertem IFN-alpha. VPAs anti-proliferative und -adhäsive Effekte in vitro und in vivo eröffnen die Perspektive für eine innovative Strategie in der Behandlung des NZK. Aufgrund der präsentierten Daten lässt sich postulieren, dass VPA und IFN-alpha die Grundlage für ein neues, effizientes Therapiekonzept bei austerapierten NZK-Patienten darstellen könnte.

7 Literaturverzeichnis

- Agouni A, Sourbier C, Danilin S, Rothhut S, Lindner V, Jacqmin D, Helwig JJ, Lang H, Massfelder T. Parathyroid hormone-related protein induces cell survival in human renal cell carcinoma through PI3K-Akt pathway: evidence for a critical role for integrin-linked kinase and nuclear Faktor kappa B. *Carcinog.* 2007; 28(9): 1893-1901.
- Ahmad T, Eisen T. Kinase inhibition with BAY43-9006 in renal cell carcinoma. *Clin Canc Res.* 2004; 10: 6388-92.
- Amato RJ, Jac J, Giessinger S, Saxena S, Willis JP. A phase 2 study with a daily regimen of the oral mTOR inhibitor RAD001 (everolimus) in patients with metastatic clear cell renal cell cancer. *Cancer.* 2009; 115(11): 2438-46.
- Andreadis D, Nomikos A, Barbatis C. Metastatic Renal Clear Cell Carcinoma in the Parotid Gland: A Study of Immunohistochemical Profile and Cell Adhesion Molecules (CAMs) Expression in Two Cases. *Pathol Oncol Res.* 2007, 13(2): 161-5.
- Annicotte JS, Culine S, Fajas L. Role of PPARgamma in the control of prostate cancer growth: a new approach for therapy. *Bull Canc.* 2007; 94(2): 135-7.
- Arnold NB, Arkus N, Gunn J, Korc M. The histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid induces growth inhibition and enhances gemcitabine-induced cell death in pancreatic cells. *Clin Canc Res.* 2007; 13: 18-26.
- Atmaca A, Al-Batran SE, Maurer A, Neumann A, Heinzel T, Hentsch B, Schwarz SE, Hovelmann S, Gottlicher M, Knuth A, Jager E. Valproic acid (VPA) in patients with refractory advanced cancer: a dose escalating phase I clinical trial. *Br J Canc.* 2007; 97: 177-82.
- Awada A, Hendlisz A, Gil T, Bartholomeus S, Mano M, de Valeriola D, Strumberg D, Brendel E, Haase CG, Schwartz B, Piccart M. Phase I safety and pharmacokinetics of BAY 43-9006 administered for 21 days on/7 days off in patients with advanced, refractory solid tumours. *Br J Canc.* 2005; 92(10): 1855-61.
- Bacon CL, Gallagher HC, haughey JC, Regan CM. Antiproliferative action of valproate is associated with aberrant expression and nuclear translocation of cyclin D3 during the C6 glioma G1 phase. *J Neurochem.* 2002; 83: 12-9.
- Bardos JI, Ashcroft M. Hypoxia-inducible factor-1 and oncogenic signalling. *Bioassays.* 2004; 26: 262-9.

- Barrett RM, Osborne TP, Wheatley SP. Phosphorylation of surviving at threonine 34 inhibits its mitotic function and enhances its cytoprotective activity. *Cell Cycle*. 2009; 8(2): 278-83.
- Baselga J, Tabernero J. Combined Antiangiogenesis and Antiepidermal Growth Factor Receptor Targeting in the Treatment of Cancer: Hold Back, We Are Not There Yet. *J Clin Oncol*. 2007; 25(29): 4516-8.
- Beecken WD, Engl T, Ogbomo H, Relja B, Cinatl J, Bereiter-Hahn J, Oppermann E, Jonas D, Blaheta RA. Valproic acid modulates NCAM polysialylation and polysialyltransferase mRNA expression in human tumor cells. *Int Immunopharmacol*. 2005; 5: 757-69.
- Beitzinger M, Hofmann L, Oswald C, Beinoraviciute-Kellner R, Sauer M, Griesmann H, Bretz AC, Burek C, Rosenwald A, Stiewe T. p73 poses a barrier to malignant transformation by limiting anchorage-independent growth. *EMBO J*. 2008; 27: 792-803.
- Bengochea A, de Souza MM, Lefrançois L, Le Roux E, Galy O, Chemin I, Kim M, Wands JR, Treppe C, Hainaut P, Scoazec JY, Vitvitski L, Merle P. Common dysregulation of Wnt/Frizzled receptor elements in human hepatocellular carcinoma. *Br J Canc*. 2008; 99(1): 143-50.
- Biffi A, Coradini D, Pellizzaro C, Pirronello E, di Fronzo G. Simultaneous but not sequential treatment with sodium butyrate improves the antiproliferative effect of alpha- or beta-interferon on a breast cancer cell line. *Anticancer Res*. 1998; 18: 4109-14.
- Blaheta RA, Michaelis M, Natsheh I, Hasenberg C, Weich E, Relja B, Jonas D, Doerr HW, Cinatl J Jr. Valproic acid inhibits adhesion of vincristine- and cisplatin-resistant neuroblastoma tumor cells to endothelium. *Br J Canc*. 2007; 96: 1699-706.
- Blaheta RA, Michaelis M, Driever PH, Cinatl J Jr. Evolving Anticancer Drug Valproic Acid: Insights into the Mechanism and Clinical Studies. *Med Res Rev*. 2005; 25(4): 383-97.
- Blaheta RA, Beecken WD, Engl T, Jonas D, Oppermann E, Hundemer M, Doerr HW, Scholz M, Cinatl J: Human Cytomegalovirus Infection of Tumor Cells Down-Regulates NCAM (CD56): A Novel Mechanism for Virus Induced Tumor Invasiveness. *Neoplasia*. 2004, 6: 323-31.
- Blaheta RA, Cinatl J Jr. Anti-tumor mechanisms of valproate: a novel role for an old drug. *Med Res Rev*. 2002; 22(5): 492-511.

- Blaheta RA, Hundemer M, Mayer G, Vogel JU, Kornhuber B, Cinatl J, Markus BH, Hernaiz Driever P, Cinatl jr J. Expression level of neural cell adhesion molecule (NCAM) inversely correlates with the ability of neuroblastoma cells to adhere to endothelium in vitro. *Cell Commun Adhes.* 2002a; 9: 131-47.
- Bouty-Boye D, Zetter BR. Inhibition of cell Motility by interferon. *Science.* 1980; 208: 516-18.
- Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov.* 2006; 5: 769-84.
- Bran B, Bran G, Hörmann K, Riedel F. The platelet-derived growth factor receptor as a target for vascular endothelial growth factor-mediated anti-angiogenic therapy in head and neck cancer. *Int J Oncol.* 2009; 34(1): 255-61.
- Brendle A, Lei H, Brandt A, Johansson R, Enquist K, Henriksson R, Hemminki K, Lenner P, Försti A. Polymorphisms in redicted microRNA-binding sites in integrin genes and breast cancer: ITGB4 as prognostic marker. *Carcinog.* 2008; 29(7): 1394-9.
- Brenner W, Greber I, Gudejko-Thiel J, Beitz S, Schneider E, Walenta S, Peters K, Unger R, Thüroff JW. Migration of renal carcinoma cells is dependent on protein kinase Cdelta via beta1 integrin and focal adhesion kinase. *Int J Oncol.* 2008; 32(5): 1125-31.
- Brew CT, Aronchik I, Kosco K, McCammon J, Bjeldanes LF, Firestone GL. Indole-3-carbinol inhibits MDA-MB-231 breast cancer cell motility and induces stress fibers and focal adhesion formation by activation of Rho kinase activity. *Int J Cancer.* 2009; 124(10): 2294-302.
- Bukowski RM, Kabbinavar FF, Figlin RA, Flaherty K, Srinivas S, Vaishampayan U, Drabkin HA, Dutcher J, Ryba S, Xia Q, Scappaticci FA, McDermott D. Randomized phase II study of erlotinib combined with bevacizumab compared with bevacizumab alone in metastatic renal cell cancer. *J Clin Oncol.* 2007; 25(29): 4536-41.
- Carew JS, Giles FJ, Nawrocki ST. Histone deacetylase inhibitors: Mechanisms of cell death and promise in combination cancer therapy. *Canc Lett.* 2008; 269(1): 7-17.
- Chen CL, Sung J, Cohen M, Chowdhury WH, Sachs MD, Li Y, Lakshmanan Y, Yung BYM, Lupold SE, Rodriguez R. Valproic Acid Inhibits Invasiveness in Bladder Cancer but Not in Prostate Cancer Cells. *J Pharmacol Experimental Therapeutics.* 2006; 319(2): 533-42.

- Cheyette BN, Waxman JS, Miller JR, Takemaru K, Sheldahl LC, Khlebtsova N, Fox EP, Earnest T, Moon RT. Dapper, a Dishevelled-associated antagonist of beta-catenin and JNK signaling, is required for notochord formation. *Dev Cell*. 2002; 2(4): 449-61.
- Choi EJ, Ahn WS. Antiproliferative effects of dehydrocostuslactone through cell cycle arrest and apoptosis in human ovarian cancer SK-OV-2 cells. *Int J Mol Med*. 2009; 23(2): 211-6.
- Chowdhury UR, Samant RS, Fodstad O, Shevde LA. Emerging role of nuclear protein 1 (NUPR1) in cancer therapy. *Canc Metastasis Rev*. 2009; 28(1-2): 225-32.
- Cinatl J Jr, Kothetkov R, Blaheta R, Driever PH, Vogel JU, Cinatl J. Induction of differentiation and suppression of malignant phenotype of human neuroblastoma BE(2)-C cells by valproic acid: enhancement by combination with interferon-alpha. *Int J Oncol*: 2002; 20: 97-106.
- Cinatl J, Cinatl J Jr, Driever PH, Kotchetkov R, Pouckova P, Kornhuber B, Schwabe B. Sodium valproate inhibits in vivo growth of human neuroblastoma cells. *Anticanc Drugs*. 1997; 8: 958-63.
- Coppin C, Le L, Porzsolt F, Wilt T. Targeted therapy for advanced renal cell carcinoma. *Cochrane Database Syst Rev*. 2008; (2): CD006017.
- Coppin C, Porzsolt F, Awa A, Kumpf J, Coldman A, Wilt T. Immunotherapy for advanced renal cell cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2005; (1): CD001425.
- Costa LJ, Gemmill RM, Drabkin HA. Upstream signaling inhibition enhances rapamycin effect on growth of kidney cancer cells. *Urology*. 2007; 69(3): 596-602.
- Daniel P. Molekulare Grundlagen der zielgerichteten Tumorthherapie. *Onkol*. 2007; 13: 8-19.
- Davidson B, Hadar R, Stavnes HT, Trope CG, Reich R. Expression of the peroxisome proliferator-activated receptor-alpha, -beta, and -gamma in ovarian carcinoma effusions is associated with poor chemoresponse and shorter survival. *Hum Pathol*. 2009; 40(5): 705-13.
- De la Cruz-Hernandez E, Perez-Cardenas E, Contreras-Paredes D, Cantu D, Mohar A, Lizano M, Duenas-Gonzalez A. The effects of DNA methylation and histone deacetylase inhibitors on human papillomavirus early gene expression in cervical cancer, an in vitro and clinical study. *Virology*. 2007; 4: 18.
- Desai SD, Wood LM, Tsai YC, Hsieh TS, Marks JR, Scott GL, Giovanella BC, Liu LF. ISG15 as a novel tumor biomarker for drug sensitivity. *Mol Canc Ther*. 2008; 7(6): 1430-9.

- Desban N, Lissitzky JC, Rousselle P, Duband JL. Alpha1beta1-integrin engagement to distinct laminin-1 domains orchestrates spreading, migration and survival of neural crest cells through independent signaling pathways. *J Cell Sci.* 2006; 119: 3206-18.
- Doehn C, Merseburger AS, Jocham D, Kuczyk MA. Is there an indication for neoadjuvant or adjuvant systemic therapy in renal cell carcinoma? *Urologe A.* 2007; 46(10): 1371-8.
- Dowdy SC, Jiang S, Zhou XC, Hou X, Jin F, Podratz KC, Jiang SW. Histone deacetylase inhibitors and paclitaxel cause synergistic effects on apoptosis and microtubule stabilization in papillary serous endometrial cancer cells. *Mol Canc Ther.* 2006; 5: 2767-76.
- Draper N, Bui M, Bouware DC, Lloyd M, Chiappori AA, Pledger WJ, Coppola D. Increased cyclin D3 expression significantly correlates with p27 nuclear positivity in gastrointestinal stromal tumors. *Hum Pathol.* 2008; 39(12): 1784-91.
- Duenas-Gonzalez A, Candelaria M, Perez-Plascencia C, Perez-Cardenas E, de la Cruz-Hernandez E, Herrera LA. Valproic acid as epigenetic cancer drug: Preclinical, clinical and transcriptional effects on solid tumors. *Canc Treatm Rev.* 2008; 34: 206-22.
- Elstner A, Holtkamp N, von Deimling A. Involvement of Hif-1 in desferrioxamine-induced invasion of glioblastoma cells. *Clin Exp Metastasis.* 2007; 24: 57-66.
- Escudier B, Szczylik C, Hutson TE, Demkow T, Staehler M, Rolland F, Negrier S, Laferriere N, Scheuring UJ, Cella D, Shah S, Bukowski RM. Randomized phase II trial of first-line treatment with sorafenib versus interferon Alfa-2a in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol.* 2009; 27(8): 1280-9.
- Escudier B, Choueiri TK, Oudard S, Szczylik C, Negrier S, Ravaud A, Chevreau C, Venner P, Champagne P, Croteau D, Dupont E, Hariton C, Bukowski RM. Prognostic factors of metastatic renal cell carcinoma after failure of immunotherapy: new paradigm from a large phase III trial with shark cartilage extract AE 941. *J Urol.* 2007; 178(5): 1901-5.
- Escudier B, Eisen T, Stadler WM, Szczylik C, Oudard S, Siebels M, Negrier S, Chevreau C, Solska E, Desai AA, Rolland F, Demkow T, Hutson TE, Gore M, Freeman S, Schwartz B, Shan M, Simantov R, Bukowski RM; TARGET Study Group. Sorafenib in advanced clear-cell renal-cell carcinoma. *N Engl J Med.* 2007a; 356(2): 125-34.

- Escudier B, Pluzanska A, Koralewski P, Ravaud A, Bracarda S, Szczylik C, Chevreau C, Filipek M, Melichar B, Bajetta E, Gorbunova V, Bay JO, Bodrogi I, Jagiello-Gruszfeld A, Moore N; AVOREN Trial investigators. Bevacizumab plus interferon alfa-2a for treatment of metastatic renal cell carcinoma: a randomised, double-blind phase III trial. *Lancet*. 2007b; 370: 2103-11.
- Fedier A, Dedes KJ, Imesch P, Von Bueren AO, Fink D. The histone deacetylase inhibitors suberoylanilide hydroxamic (Vorinostat) and valproic acid induce irreversible and MDR1-independent resistance in human colon cancer cells. *Int J Oncol*. 2007; 31: 633-41.
- Feng Q, Sekula D, Guo Y, Liu X, Black CC, Galimberti F, Shah SJ, Sempere LF, Memoli V, Andersen JB, Hassel BA, Dragnev K, Dmitrovsky E. UBE1L causes lung cancer growth suppression by targeting cyclin D1. *Mol Canc Ther*. 2008; 7(12): 3780-8.
- Flintoff-Dye NL, Welser J, Rooney J, Scowen P, Tamowski S, Hatton W, Burkin DJ. Role for the alpha7beta1 integrin in vascular development and integrity. *Dev Dyn*. 2005; 234: 11-21.
- Fossa SD. Interferon in metastatic renal cell carcinoma. *Semin Oncol*. 2000; 27: 187-93.
- Fu M, Rao M, Bouras T, Wang C, Wu K, Zhang X, Li Z, Yao TP, Pestell RG. Cyclin D1 inhibits peroxisome proliferator-activated receptor gamma-mediated adipogenesis through histone deacetylase recruitment. *J Biol Chem*. 2005; 280(17): 16934-41.
- Fu P, Jiang X, Arcasoy MO. Constitutively active erythropoietin receptor expression in breast cancer cells promotes cellular proliferation and migration through a MAP-kinase dependent pathway. *Biochem Biophys Res Commun*. 2009; 379(3): 696-701.
- Fuino L, Bali P, Wittmann S, Donapaty S, Guo F, Yamaguchi H, Wang HG, Atadja P, Bhalla K. Histone deacetylase inhibitor LAQ824 down-regulates Her-2 and sensitizes human breast cancer cells to trastuzumab, taxotere, gemcitabine and epothilone B. *Mol Canc Ther*. 2003; 2: 971-84.
- Gao X, Wen J, Zhang L, Li X, Ning Y, Meng A, Chen YG. Dapper1 is a nucleocytoplasmic shuttling protein that negatively modulates Wnt signaling in the nucleus. *J Biol Chem*. 2008; 283(51): 35679-88.
- Gati A, Da Rocha S, Guerra N, Escudier B, Moretta A, Chouaib S, Angevin E, Caignard A. Analysis of the natural killer mediated immune response in metastatic renal cell carcinoma patients. *Int J Cancer*. 2004; 109(3): 393-401.

- Gelebart P, Anand M, Armanious H, Peters AC, Dien Bard J, Amin HM, Lai R. Constitutive activation of the Wnt canonical pathway in mantle cell lymphoma. *Blood*. 2008, 112(13): 5171-9.
- Glaser KB. HDAC inhibitors: clinical update and mechanism-based potential. *Biochem Pharmacol*. 2007; 74: 659-71.
- Gloy J, Hikasa H, Sokol SY. Frigo interacts with Dishevelled to transduce Wnt signals. *Nat Cell Biol*. 2002; 4(5): 351-7.
- Goldenberg SJ, McDermott JL, Butt TR, Mattern MR, Nicholson B. Strategies for the identification of novel inhibitors of deubiquitinating enzymes. *Biochem Soc Trans*. 2008; 36: 828-32.
- Goto I, Yamamoto-Yamaguchi Y, Honma Y. Enhancement of sensitivity of human lung adenocarcinoma cells to growth-inhibitory activity of interferon alpha by differentiation-inducing agents. *Br J Canc*. 1996; 74(4): 546-54.
- Göttlicher M, Minucci S, Zhu P, Kramer OH, Schimpf A, Giavara S, Sleeman JP, Lo Coco F, Nervi C, Pelicci PG, Heinzl T. Valproic acid defines a novel class of HDAC inhibitors inducing differentiation of transformed cells. *EMBO J*. 2001; 20: 6969-78.
- Graff JR, Deddens JA, Konicek BW, Colligan BM, Hurst BM, Carter HW, Carter JH. Integrin-linked kinase expression increases with prostate tumor grade. *Clin Canc Res*. 2001; 7: 1987-91.
- Guo W, Giancotti FG. Integrin signalling during tumour progression. *Nat Rev Mol Cell Biol*. 2004; 5: 816-26.
- Gurvich N, Tsygankova OM, Meinkoth JL, Klein PS. Histone deacetylase is a target of valproic acid-mediated cellular differentiation. *Canc Res*. 2004; 64: 1079-86.
- Hager M, Haufe H, Kemmerling R, Hitzl W, Mikuz G, Moser PL, Kolbitsch C. Increased Activated Akt Expression in Renal Cell Carcinoma and Prognosis. *J Cell Mol Med*. 2008; im Druck.
- Halkidou K, Gaughan L, Cook S, Leung HY, Neal DE, Robson CN. Upregulation and nuclear recruitment of HDAC1 in hormone refractory prostate cancer. *Prostate*. 2004; 59: 177-89.
- Hanahan D, Weinberg RA. The hallmark of cancer. *Cell*. 2000; 100: 57-70.
- Hapke S, Kessler H, Lubber B, Benge A, Hutzler P, Hofler H, Schmitt M, Reuning U. Ovarian cancer cell proliferation and motility is induced by engagement of integrin alpha(v)beta3/Vitronectin interaction. *Biol Chem*. 2003; 384: 1073-83.

- Hedberg Y, Davoodi E, Ljungberg B, Roos G, Landberg G. Cyclin E and p27 protein content in human renal cell carcinoma: clinical outcome and associations with cyclin D. *Int J Canc.* 2002; 102: 601-7.
- Hedberg Y, Roos G, Ljungberg B, Landberg G. Cyclin D3 protein content in renal cell carcinoma in relation to cyclin D1 and clinico-pathological parameters. *Acta Oncol.* 2002a; 41: 175-81.
- Herman JG, Latif F, Weng Y, Lerman MI, Zbar B, Liu S, Samid D, Duan DS, Gnarr JR, Linehan WM et al. Silencing of the VHL tumor-suppressor gene by DNA methylation in renal carcinoma. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1994; 91(21): 9700-4.
- Hicklin DJ, Ellis LM. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. *J Clin Oncol.* 2005; 23(5): 1011-27.
- Hough CD, Cho KR, Zonderman AB, Schwartz DR, Morin PJ. Coordinately up-regulated genes in ovarian cancer. *Cancer Res.* 2001; 61(10): 3869-76.
- Hrzenjak A, Moinfar F, Kremser ML, Strohmeier B, Staber PB, Zatloukal K, Denk H. Volproate inhibition of histone deacetylase 2 affects differentiation and decreases proliferation of endometrial stromal sarcoma cells. *Mol Canc Ther.* 2006; 5(9): 2203-10.
- Huang L, Li B, Li W, Guo H, Zou F. ATP-sensitive Potassium Channels Control Glioma Cells Proliferation by Regulating ERK Activity. *Carcinogenesis.* 2009; 30(5): 737-44.
- Hudes G, Carducci M, Tomczak P, Dutcher J, Figlin R, Kapoor A, Staroslawska E, Sosman J, McDermott D, Bodrogi I, Kovacevic Z, Lesovoy V, Schmidt-Wolf IG, Barbarash O, Gokmen E, O'Toole T, Lustgarten S, Moore L, Motzer RJ; Global ARCC Trial. Temsirolimus, interferon alfa, or both for advanced renal-cell carcinoma. *N Engl J Med.* 2007; 356(22): 2271-81.
- Hudson CC, Liu M, Chiang GG, Otterness DM, Loomis DC, Kaper F, Giaccia AJ, Abraham RT. Regulation of hypoxia-inducible factor 1alpha expression and function by the mammalian target of rapamycin. *Mol Cell Biol.* 2002; 22(20): 7004-14.
- Igawa M, Rukstalis DB, Tanabe T, Chodak GW. High Levels of nm23 Expression Are Related to Cell Proliferation in human Prostate Cancer. *Canc Res.* 1994; 54: 1313-18.
- Isaacs A, Lindenmann J. Virus interference. I. The interferon. *Proc R Soc Lond B Biol Sci.* 1957; 147(927): 258-67.

- Jee CD, Kim MA, Jung EJ, Kim J, Kim WH. Identification of genes epigenetically silenced by CpG methylation in human gastric carcinoma. *Eur J Canc.* 2009; 45(7): 1282-93.
- Jia Y, Wu SL, Isenberg JS, Dai S, Sipes JM, Field L, Zeng B, Bandle RW, Ridnour LA, Wink DA, Ramchandran R, Karger BL, Roberts DD. Thiolutin inhibits endothelial cell adhesion by perturbing Hsp27 interactions with components of the actin and intermediate filament cytoskeleton. *Cell Stress Chaperones.* 2009; im Druck.
- Jiang X, Tan J, Li J, Kivimäe S, Yang X, Zhuang L, Lee PL, Chan MT, Stanton LW, Liu ET, Cheyette BN, Yu Q. DACT3 is an epigenetic regulator of Wnt/beta-catenin signaling in colorectal cancer and is a therapeutic target of histone modifications. *Cancer Cell.* 2008; 13(6): 529-41.
- Jin JS, Hsieh DS, Lin YF, Wang JY, Sheu LF, Lee WH. Increasing expression of extracellular matrix metalloprotease inducer in renal cell carcinoma: tissue microarray analysis of immunostaining score with clinicopathological parameters. *Int J Urol.* 2006; 13: 573-80.
- Johnston B, Kim CH, Soler D, Emoto M, Butcher EC. Differential chemokine responses and homing patterns of murine TCR alpha beta NKT cell subsets. *J Immunol.* 2003; 171(6): 2960-9.
- Johnstone RW. Histone-deacetylase inhibitors: novel drugs for the treatment of cancer. *Nat Rev Drug Discov.* 2002; 1: 287-99.
- Jones J, Berkhoff S, Weich E, Engl T, Wedel S, Relja B, Jonas D, Blaheta RA. Transient down-regulation of beta1 integrin subtypes on kidney carcinoma cells is induced by mechanical contact with endothelial cell membranes. *J Cell Mol Med.* 2007; 11: 826-38.
- Jones J, Marian D, Weich E, Engl T, Wedel S, Relja B, Jonas D, Blaheta RA. CXCR4 chemokine receptor engagement modifies integrin dependent adhesion of renal carcinoma cells. *Exp Cell Res.* 2007a; 313: 4051-65.
- Kamura T, Sato S, Iwai K, Czyzyk-Krzeska M, Conaway RC, Conaway JW. Activation of HIF1alpha ubiquitination by a reconstituted von Hippel-Lindau (VHL) tumor suppressor complex. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97(19): 10430-5.
- Kaneko F, Saito H, Saito Y, Wakabayashi K, Nakamoto N, Tada S, Suzuki H, Tsunematsu S, Kumagai N, Ishii H. Down-regulation of matrix-invasive potential of human liver cancer cells by type I interferon and a histone deacetylase inhibitor sodium butyrate. *Int J Oncol.* 2004; 24: 837-45.

- Kato K, Shiga K, Yamaguchi K, Hata K, Kobayashi T, Miyazaki K, Saijo S, Miyagi T. Plasma-membrane-associated sialidase (NEU3) differentially regulates integrin-mediated cell proliferation through laminin- and fibronectin-derived signalling. *Biochem J.* 2006; 394: 647-56.
- Katoh M. WNT signaling in stem cell biology and regenerative medicine. *Curr Drug Targets.* 2008; 9(7): 565-70.
- Katsuno Y, Suzuki A, Sugimura K, Okumura K, Zineldeen DH, Shimada M, Niida H, Mizuno T, Hanaoka F, Nakanishi M. Cyclin A-Cdk1 regulates the origin firing program in mammalian cells. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; 106(9): 3184-9.
- Kaur S, Sassano A, Joseph AM, Majchrzak-Kita B, Eklund EA, Verma A, Brachmann SM, Fish EN, Plataniias LC. Dual regulatory role of phosphatidylinositol 3-kinase in IFN signaling. *J Immunol.* 2008; 181(10): 7316-23.
- Kelly WK, Marks PA. Drug insight: Histone deacetylase inhibitors-development of the new targeted anticancer agent suberoylanilide hydroxamic acid. *Nat Clin Pract Oncol.* 2005; 2: 150-7.
- Kerbel R, Folkman J. Clinical translation of angiogenesis inhibitors. *Nat Rev Canc.* 2002; 2: 727-39.
- Khan ANH, Magner WJ, Tomasi TB. An epigenetic vaccine model active in the prevention and treatment of melanoma. *J Transl Med.* 2007; 5: 64-76.
- Kim MS, Blake M, Baek JH, Kohlhagen G, Pommier Y, Carrier F. Inhibition of histone deacetylase increases cytotoxicity to anticancer drugs targeting DNA. *Cancer Res.* 2003; 63: 7291-300.
- Kim WY, Kaelin WG. Role of VHL gene mutation in human cancer. *J Clin Oncol.* 2004; 22(24): 4991-5004.
- Kiuchi-Saishin Y, Gotoh S, Furuse M, Takasuga A, Tano Y, Tszkita S. Differential expression patterns of claudins, tight junction membrane proteins, in mouse nephron segments. *J Am Soc Nephrol.* 2002; 13: 875-86.
- Klein RM, Aplin AE. Rnd3 regulation of the actin cytoskeleton promotes melanoma migration and invasive outgrowth in three dimensions. *Canc Res.* 2009; 69(6): 2224-33.
- Kothapalli D, Zhao L, Hawthorne EA, Cheng Y, Lee E, Pure E, Assoian RK. Hyaluronan and CD44 antagonize mitogen-dependent cyclin D1 expression in mesenchymal cells. *J Cell Biol.* 2007; 176(4): 535-44.
- Kotrikadze N, Alibegashvili M, Zibzibadze M, Abashidze N, Chigogidze T, Managadze L, Artsivadze K. Activity and content of antioxidant enzymes in prostate tumors. *Exp Oncol.* 2008; 30(3): 244-7.

- Krämer OH, Baus D, Knauer SK, Stein S, Jäger E, Stauber RH, Grez M, Pfitzner E, Heinzel T. Acetylation of Stat1 modulates NF- κ B activity. *Genes Dev.* 2006; 20: 473-85.
- Kuefer R, Hofer MD, Altug V, Zorn C, Genze F, Kunzi-Rapp K, Hautmann RE, Gschwend JE. Sodium butyrate and trigutyrin induce in vivo growth inhibition and apoptosis. *Br J Canc.* 2004; 90: 535-41.
- Kuendgen A, Gattermann N. Valproic Acid for the Treatment of Myeloid Malignancies. *Canc.* 2007; 110(5): 943-54.
- Kuljaca S, Liu T, Tee AE, Haber M, Norris MD, Dwarto T, Marshall GM. Enhancing the anti-angiogenic action of histone deacetylase inhibitors. *Mol Canc.* 2007; 6: 68. doi:10.1186/1476-4598-6-68.
- Kumagai T, Akagi T, Desmond JC, Kawamata N, Gery S, Imai Y, Song JH, Gui D, Said J, Koeffler HP. Epigenetic regulation and molecular characterization of C/EBPalpha in pancreatic cancer cells. *Int J Canc.* 2009; 124(4): 827-33.
- Kunapuli SP, Sing H, Sing P, Kumar A. Ceruloplasmin gene expression in human cancer cells. *Life Sci.* 1987; 40(23): 2225-8.
- Kwok JC, Richardson DR. The iron metabolism of neoplastic cells: alteration that facilitate proliferation? *Crit Rev Oncol Hematol.* 2002; 42: 65-78.
- Langner C, von Wasielewski R, Ratschek M, Rehak P, Zigeuner R. Biological significance of p27 and Skp2 expression in renal cell carcinoma. A systematic analysis of primary and metastatic tumour tissues using a tissue microarray technique. *Virochows Arch.* 2004; 445: 631-6.
- Latif F, Tory K, Gnarr J, Yao M, Duh FM, Orcutt ML, Stackhouse T, Kuzmin I, Modi W, Geil L et al. Identification of the von Hippel-Lindau disease tumor suppressor gene. *Science.* 1993; 260(5112): 1317-20.
- Lee J, Jung HH, Im YH, Kim JH, Park JO, Kim K, Kim WS, Ahn JS, Jung CW, Park YS, Kang WK, Park K. Interferon- α resistance can be reversed by inhibition of IFN- α -induced COX-2 expression potentially via STAT1 activation in A549 cells. *Oncol Rep.* 2006; 15: 1541-9.
- Lee JC, Maa MC, Yu HS, Wang JH, Yen CK, Wang ST, Chen YJ, Liu Y, Jin YT, Leu TH. Butyrate regulates the expression of c-Src and focal adhesion kinase and inhibits cell invasion of human colon cancer cells. *Mol Carcinog.* 2005; 43: 207-14.
- Lennartsson A, Ekwall K. Histone modification patterns and epigenetic codes. *Biochim Biophys Acta.* 2009; im Druck.

- Levidou G, Korkolopoulou P, Thymara I, Vassilopoulos I, Saetta AA, Gakiopoulou H, Konstantinidou A, Kairi-Vassilatou E, Pavlakis K, Patsouris E. Expression and prognostic significance of cyclin D3 in ovarian adenocarcinomas. *Int J Gynecol Pathol.* 2007; 26: 410-7.
- Li H, Wu X. Histone deacetylase inhibitor, Trichostatin A, activates p21WAF1/Cip1 expression through downregulation of c-myc and release of the repression of c-myc from the promoter in human cervical cancer cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 324(2): 860-7.
- Li L, Zhang R, Fang ZY, Chen JN, Zhu ZL. Suppression of Vascular Endothelial Growth Factor (VEGF) Expression by Targeting the Bcr-Abl Oncogene and Protein Tyrosine Kinase Activity in Bcr-Abl-positive Leukaemia Cells. *J Int Med Res.* 2009; 37(2): 426-37.
- Li Q, Tang L, Roberts PC, Kraniak JM, Fridman AL, Kulaeva OI, Tehrani OS, Tainsky MA. Interferon regulatory factors IRF5 and IRF7 inhibit growth and induces senescence in immortal Li-Fraumeni fibroblasts. *Mol Canc Res.* 2008; 6(5): 770-84.
- Li XN, Shu Q, Su JM, Perlaky L, Blaney SM, Lau CC. Valproic acid induces growth arrest, apoptosis, and senescence in medulloblastomas by increasing histone hyperacetylation and regulating expression of p21Cip1, CDK4, and CMYC. *Mol Cancer Ther.* 2005; 4(12): 1912-22.
- Li C, Wong WH. Model-based analysis of oligonucleotide arrays: Expression index computation and outlier detection. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2001; 98: 31-6.
- Lim SD, Young AN, Paner GP, Amin MB. Prognostic role of CD44 cell adhesion molecule expression in primary and metastatic renal cell carcinoma: a clinicopathologic study of 125 cases. *Virchows Arch.* 2008; 452(1): 49-55.
- Lin CT, Lai HC, Lee HY, Lin WH, Chang CC, Chu TY, Lin YW, Lee KD, Yu MH. Valproic acid resensitizes cisplatin-resistant ovarian cancer cells. *Cancer Sci.* 2008; 99: 1218-26.
- Lin JJ, Li Y, Eppinga RD, Wang Q, Jin JP. Chapter 1: roles of caldesmon in cell motility and actin cytoskeleton remodeling. *Int Rev Cell Mol Biol.* 2009; 274: 1-68.
- Lin KY, Lu D, Hung CF, Peng S, Huang L, Jie C, Murillo F, Rowley J, Tsai YC, He L, Kim DJ, Jaffee E, Pardoll D, Wu TC. Ectopic Expression of Vascular Cell Adhesion Molecule-1 as a New Mechanism for Tumor Immune Evasion. *Canc Res.* 2007; 67: 1832-41.
- Longo R, D'Andrea MR, Sarmiento R, Salerno F, Gasparini G. Integrated therapy of kidney cancer. *Ann Oncol.* 2007; 18(6): 141-8.

- LoPiccolo J, Blumenthal GM, Bernstein WB, Dennis PA. Targeting the PI3K/Akt/mTOR pathway: effective combinations and clinical considerations. *Drug Resist Update*. 2008; 11: 32-50.
- Lu C, Wang W, El-Deiry WS. Non-genotoxic anti-neoplastic effects of ellipticine derivate NSC176327 in p53-deficient human colon carcinoma cells involve stimulation of p73. *Canc Biol Ther*. 2008; 7(12): 2039-46.
- Lucero Gritti MF, Beviacqua M, Bordenave RH, Rumi LS. Interferon-alpha 2b modulation of doxorubicin sensitivity in multidrug resistant cell line. *J Exp Clin Canc Res*. 2001; 20: 393-400.
- Luger K, Mader AW, Richmond RK, Sargent DF, Richmond TJ. Crystal structure of the nucleosome core particle at 2,8 A resolution. *Nature*. 1998; 389: 251-60.
- Lui T, Kuljaca S, Tee A, Marshall GM. Histone deacetylase inhibitors: multifunctional anticancer agents. *Cancer Treat Rev*. 2006; 32: 157-65.
- Luo JH, Ren B, Keryanov S, Tseng GC, Rao UN, Monga SP, Strom S, Demetris AJ, Nalesnik M, Yu YP, Ranganathan S, Michalopoulos GK. Transcriptomic and genomic analysis of human hepatocellular carcinomas and hepatoblastomas. *Hepatology*. 2006; 44(4): 1012-24.
- Machesky LM, Hall A. Role of Actin Polymerisation and Adhesion to Extracellular Matrix in Rac- and Rho-induced Cytoskeletal Reorganisation. *J Cell Biol*. 1997; 138(4): 913-26.
- Maehata T, Taniguchi H, Yamamoto H, Nosho K, Adachi Y, Miyamoto N, Miyamoto C, Akutsu N, Yamaoka S, Itho F. Transcriptional silencing of Dickkopf gene family by CpG island hypermethylation in human gastrointestinal cancer. *World J Gastroenterol*. 2008; 14(17): 2702-14.
- Mancuso A, Sternberg CN. What's new in the treatment of metastatic kidney cancer? *BJU Int*. 2005; 95(9): 1171-80.
- Manjula S, Aroor AR, Raja A, Rao SN, Rao A. Elevation of serum ceruloplasmin levels in brain tumours. *Acta Neurol Scand*. 1992; 86(2): 156-8.
- Manohar A, Shome SG, Lamar J, Stirling L, Iyer V, Pumiglia K, DiPersio CM. Alpha 3 beta 1 integrin promotes keratinocyte cell survival through activation of a MEK/ERK signaling pathway. *J Cell Sci*. 2004; 117: 4043-54.
- Marhaba R, Zöller M. CD44 in cancer progression: Adhesion, migration and growth regulation. *J Mol Histol*. 2004; 35: 211-31.
- Markovic-Lipkovski J, Brasanac D, Muller GA, Muller CA. Cadherins and integrins in renal cell carcinoma: an immunohistochemical study. *Tumori*. 2001; 87: 173-8.
- Marks P, Rifkind RA, Richon VM, Breslow R, Miller T, Kelly WK. Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat Rev Canc*. 2001; 1: 194-202.

- Mayo MW, Denlinger CE, Broad RM, Yeung F, Reilly ET, Shi Y, Jones DR. Ineffectiveness of histone deacetylase inhibitors to induce apoptosis involves the transcriptional activation of NF-kappa B through the Akt pathway. *J Biol Chem.* 2003; 278: 18980-9.
- McMurtry V, Simeone AM, Nieves-Alicea R, Tari AM. Leptin utilizes Jun N-terminal kinases to stimulate the invasion of MCF-7 breast cancer cells. *Clin Exp Metastasis.* 2008; 26(3): 197-204.
- Merrick KA, Larochelle S, Zhang C, Allen JJ, Shokat KM, Fisher RP. Distinct Activation Pathways Confer Cyclin-Binding Specificity on Cdk1 and Cdk2 in Human Cells. *Mol Cell.* 2008; 32: 662-72.
- Merseburger AS, Hennenlotter J, Kuehs U, Simon P, Kruck S, Koch E, Stenzl A, Kuczyk MA. Activation of PI3K is associated with reduced survival in renal cell carcinoma. *Urol Int.* 2008; 80(4): 372-7.
- Merseburger AS, Kuczyk MA. Der Stellenwert der Targeted-Therapie beim Nierenzellkarzinom. *Urol.* 2008; 47: 1303-10.
- Michaelis M, Michaelis UR, Fleming I, Suhan T, Cinatl J, Blaheta RA, Hoffmann K, Kotchetkov R, Busse R, Nau H, Cinatl J Jr.: Valproic acid inhibits angiogenesis in vitro and in vivo. *Mol Pharmacol.* 2004; 65: 520-7.
- Michaelis M, Suhan T, Cinatl J, Driever PH, Ciantl J Jr. Valproic acid and interferon-alpha synergistically inhibit neuroblastoma cell growth in vitro and in vivo. *Int J Oncol.* 2004a; 25(6): 1795-9.
- Migita T, Oda Y, Naito S, Tsuneyoshi M. Low expression of p27(Kip1) is associated with tumor size and poor prognosis in patients with renal cell carcinoma. *Canc.* 2002; 94(4): 973-9.
- Miles A, Liaskou E, Eksteen B, Lalor PF, Adams DH. CCL25 and CCL28 promote alpha4 beta7-integrin-dependent adhesion of lymphocytes to MAdCAM-1 under shear flow. *Am J Physiol Gastrointest Liver Physiol.* 2008; 294(5): G1257-67.
- Mizuno R, Ova M, Shiomi T, Marumo K, Okada Y, Murai M. Inhibition of MKP-1 expression potentiates JNK related apoptosis in renal cancer cells. *J Urol.* 2004; 172(2): 723-7.
- Mologni L, Cleris L, Magistrini V, Piazza R, Boschelli F, Formelli F, Gambacorti-Passerini C. Valproic acid enhances bosutinib cytotoxicity in colon cancer cells. *Int J Canc.* 2008; 124(8): 1990-6.
- Morrison H, Sherman LS, Legg J, Banine F, Isacke C, Haipek CA, Gutmann DH, Ponta H, Herrlich P. The NF2 tumor suppressor gene product, merlin, mediates contact inhibition of growth through interaction with CD44. *Genes Dev.* 2001; 15: 968-80.

- Moschos SJ, Drogowski LM, Reppert SL, Kirkwood JM. Integrins and cancer. *Oncology (Williston Park)*. 2007; 21(9): 13-20.
- Motzer RJ, Hutson TE, Tomczak P, Michaelson MD, Bukowski RM, Rixe O, Oudard S, Negrier S, Szczylik C, Kim ST, Chen I, Bycott PW, Baum CM, Figlin RA. Sunitinib versus interferon alfa in metastatic renal-cell carcinoma. *N Engl J Med*. 2007; 356(2): 115-24.
- Motzer RJ, Bukowski RM. Targeted therapy for metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2006; 24(35): 5601-8.
- Motzer RJ, Michaelson MD, Redman BG, Hudes GR, Wilding G, Figlin RA, Ginsberg MS, Kim ST, Baum CM, DePrimo SE, Li JZ, Bello CL, Theuer CP, George DJ, Rini BI. Activity of SU11248, a multitargeted inhibitor of vascular endothelial growth factor receptor and platelet-derived growth factor receptor, in patients with metastatic renal cell carcinoma. *J Clin Oncol*. 2006a; 24(1): 16-24.
- Motzer RJ, Rini BI, Bukowski RM, Curti BD, George DJ, Hudes GR, Redman BG, Margolin KA, Merchan JR, Wilding G, Ginsberg MS, Bacik J, Kim ST, Baum CM, Michaelson MD. Sunitinib in patients with metastatic renal cell carcinoma. *JAMA*. 2006b; 295(21): 2516-24.
- Motzer RJ, Russo P. Systemic therapy for renal cell carcinoma. *J Urol*. 2000; 163: 408-17.
- Munster P, Marchion D, Bicaku E, Schmitt M, Lee JH, DeConti R, Simon G, Fishman M, Minton S, Garrett C, Chiappori A, Lush R, Sullivan D, Daud A. Phase I trial of histone deacetylase inhibition by valproic acid followed by the topoisomerase II inhibitor epirubicin in advanced solid tumors: a clinical and translational study. *J Clin Oncol*. 2007; 25: 1979-85.
- Muscolini M, Cianfrocca R, Sajeva A, Mozzetti S, Ferrandina G, Costanzo A, Tuosto L. Trichostatin A up-regulates p73 and induces Bax-dependent apoptosis in cisplatin-resistant ovarian cancer cells. *Mol Canc Ther*. 2008; 7(6): 1410-9.
- Nakajima A, Tomimoto A, Fujita K, Sugiyama M, Takahshi H, Ikeda I, Hosono K, Endo H, Yoneda K, Iida H, Inamori M, Kubota K, Saito S, Nakajima N, Wada K, Nagashima Y, Nakagama H. Inhibition of peroxisome proliferator-activated receptor gamma activity suppresses pancreatic cancer cell motility. *Canc Sci*. 2008; 99(10): 1892-900.
- Nakamura T, Nakamura T, Matsumoto K. The function and possible significance of Kremen as the gatekeeper of Wnt signalling in development and pathology. *J Cell Mol Med*. 2008; 12(2): 391-408.

- Naschberger E, Croner RS, Merkel S, Dimmler A, Tripal P, Amann KU, Kremmer E, Brueckl WM, Papadopoulos T, Hohenadl C, Hohenberger W, Stürzl M. Angiostatic immune reaction in colorectal carcinoma: Impact on survival and perspectives for antiangiogenic therapy. *Int J Canc.* 2008; 123: 2120-9.
- Negier S, Perol D, Ravaud A, Chevreau C, Bay JO, Delva R, Sevin E, Caty A, Escudier B. Medroxyprogesterone, interferone alfa-2a, interleukin 2 or combination of both cytokines in patients with metastatic renal carcinoma of intermediate prognosis: results of a randomized controlled trail. *Canc.* 2007; 110(11): 2468-77.
- Nemeth Z, Szasz AM, Tatrai P, Nemeth J, Györffy H, Somoracz A, Szijarto A, Kupcsulik P, Kiss A, Schaff Z. Claudin-1, -2, -3, -4, -7, -8, and -10 Protein Expression in Biliary Tract Cancers. *J Histochem Cytochem.* 2009; 57(2): 113-21.
- Nicholson K, Anderson NG. The protein kinase B/Akt signalling pathway in human malignancy. *Cell Signal.* 2002; 14: 381-95.
- Noh KH, Kang TH, Kim JH, Pai SI, Lin KY, Hung CF, Wu TC, Kim TW. Activation of Akt as a Mechanism for Tumor Immune Evasion. *Mol Ther.* 2008; 17(3): 439-47.
- Oberneder R, Wagner H, Siebels M, Stieber P, Busch M, Weiss M. Nierenzellkarzinom. Tumorzentrum München & W. Zuckschwerdt Verlag München. 2003; Manual: 79-97.
- Oertl A, Relja B, Makarevic J, Weich E, Höfler S, Jones J, Jonas D, Bratzke H, Baer PC, Blaheta, RA. Altered expression of β 1 integrins in renal carcinoma cell lines exposed to the differentiation inducer valproic acid. *Intern J of Mol Med.* 2006; 18: 347-54.
- Okamoto E, Kinne RK, Sökeland J. Interferons modify in vitro proliferation of human bladder transitional cell carcinoma in the presence of doxorubicin and mitomycin C. *J Urol.* 1996; 156:1492-5.
- Okamura M, Yamaji S, Nagashima Y, Nishikawa M, Yoshimoto N, Kido Y, Iemoto Y, Aoki I, Ishigatsubo Y. Prognostic value of integrin beta1-ILK-pAkt signaling pathway in non-small cell lung cancer. *Hum Pathol.* 2007; 38(7): 1081-91.
- Olshavsky NA, Groh EM, Comstock CE, Morey LM, Wang Y, Revelo MP, Burd C, Meller J, Knudsen KE. Cyclin D3 action in androgen receptor regulation and prostate cancer. *Oncogene.* 2007; 27(22): 3111-21.
- Ou YC, Yang CR, Cheng CL, Raung SL, Hung YY, Chen CJ. Indomethacin induces apoptosis in 786-O renal cell carcinoma cells by activating mitogen-activated protein kinases and AKT. *Eur J Pharmacol.* 2007; 563: 49-60.

- Paradis V, Lagha NB, Zeimoura L, Blanchet P, Eschwege P, Ba N, Benoît G, Jardin A, Bedossa P. Expression of vascular endothelial growth factor in renal cell carcinomas. *Virchows Arch.* 2000; 436(4): 351-6.
- Pertia A, Nikoleishvili D, Trsintsadze O, Gogokhia N, Managadze L, Chkhotua A. Loss of p27(Kip1) CDKI is a predictor of poor recurrence-free and cancer-specific survival in patients with renal cancer. *Int Urol Nephrol.* 2007; 39: 381-7.
- Perut F, Cenni E, Unger RE, Kirkpatrick CJ, Giunti A, Baldini N. Immunogenic properties of renal cell carcinoma and the pathogenesis of osteolytic bone metastases. *Int J Oncol.* 2009; 34(5): 1387-93.
- Peter Y, Comellas A, Levantini E, Ingenito EP, Shapiro SD. Epidermal growth factor receptor and claudin-2 participate in A549 permeability and remodeling: Implications for non-small cell lung cancer tumor colonization. *Mol Carcinog.* 2008; 48(6): 488-97.
- Phiel CJ, Zhang F, Huang EY, Guenther MG, Lazar MA, Klein PS. Histone deacetylase is a direct target of valproic acid, a potent anticonvulsant, mood stabilizer, and teratogen. *J Biol Chem.* 2001; 276: 36734-41.
- Pisani P, Parkin DM, Ferlay J. Estimates of the worldwide mortality from eighteen major cancers in 1985. Implications for prevention and projections of future burden. *Int J Cancer.* 1993; 55(6): 891-903.
- Plataras JP, Kim SH, Liu YY, Dicker DT, Dorsey JF, McDonough J, Cerniglia G, Rajendran RR, Gupta A, Rustgi AK, Diehl JA, Smith CD, Flaherty KT, El-Deiry WS. Cell Cycle-Dependent and Schedule-Dependent Antitumor Effects of Sorafenib Combined with Radiation. *Canc Res.* 2007; 67(19): 9443-54.
- Popova EY, Krauss SW, Short SA, Lee G, Villalobos J, Ezzell J, Koury MJ, Ney PA, Chasis JA, Grigoryev SA. Chromatin condensation in terminally differentiating mouse erythroblasts does not involve special architectural proteins but depends on histone deacetylation. *Chromosome Res.* 2009; 17(1): 47-64.
- Powelka AM, sun J, Li J, Gao M, Shaw LM, Sonnenberg A, Hsu VW. Stimulation-dependent recycling of integrin beta1 regulated by ARF6 and Rab11. *Traffic.* 2004; 5: 20-36.
- Pyrhönen S, Salminen E, Ruutu M, Lehtonen T, Nurmi M, Tammela T, Juusela H, Rintala E, Hietanen P, Kellokumpu-Lehtinen PL. Prospective randomized trial of interferon alfa-2a plus vinblastine versus vinblastine alone in patients with advanced renal cell cancer. *J Clin Oncol.* 1999; 17: 2859-67.
- Ramalho-Santos M, Yoon S, Matsuzaki Y, Mulligan RC, Melton DA. "Stemness": Transcriptional profiling of embryonic and adult stem cells. *Science.* 2002; 298: 597-600.

- Reckamp KL, Figlin RA, Moldawer N, Pantuck AJ, Belldegrun AS, Burdick MD, Strieter RM. Expression of CXCR3 on mononuclear cells and CXCR3 ligands in patients with metastatic renal cell carcinoma in response to systemic IL-2 therapy. *J Immunother.* 2007; 30(4): 417-24.
- Richmond A, Fan GH, Dhawan P, Yang J. How do chemokine/chemokine receptor activations affect tumorigenesis? *Novartis Found Symp.* 2004; 256: 74-89.
- Richon VM, Sandhoff TW, Rifkind RA, Marks PA. Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2000; 97: 10014-19.
- Rikiishi H, Shinohara F, Sato T, Sato Y, Suzuki M, Echigo S. Chemosensitization of oral squamous cell carcinoma cells to cisplatin by histone deacetylase inhibitor, suberoylanilide hydroxamic acid. *Int J Oncol.* 2007; 30; 1181-88.
- Rini BI, Jaeger E, Weinberg V, Sein N, Chew K, Fong K, Simko J, Small EJ, Waldman FM. Clinical response to therapy targeted at vascular endothelial growth factor in metastatic renal cell carcinoma: impact of patient characteristics and Von Hippel-Lindau gene status. *BJU Int.* 2006; 98(4): 756-62.
- Robb VA, Karbowniczek M, Klein-Szanto AJ, Henske EP. Activation of the mTOR signalling pathway in renal cell carcinoma. *J Urol.* 2007; 177: 346-52.
- Rocchi P, Tonelli R, Camerin C. p21Waf1/Cip1 is a common target induced by short-chain fatty acid HDAC inhibitors (valproic acid, tributyrin and sodium butyrate) in neuroblastoma cells. *Oncol Rep.* 2005; 13: 1139-44.
- Rohan JN, Weigel NL. 1,25(OH)2D3 reduces c-Myc expression, inhibiting proliferation and causing G1 accumulation in C4-2 prostate cancer cells. *Endocrinology.* 2009; 150(5): 2046-54.
- Rojas P, Cadenas MB, Lin PC, Benavides F, Conti CJ, Rodriguez-Puebla ML. Cyclin D2 and cyclin D3 play opposite roles in mouse skin carcinogenesis. *Oncogene.* 2007; 26: 1723-30.
- Rosenbluth JM, Pieterpol JA. The jury is in: p73 is a tumor suppressor after all. *Genes Dev.* 2008; 22: 2591-5.
- Santini V, Gozzini A, Ferrari G. Histone Deacetylase Inhibitors: Molecular and Biological Activity as a Premise to Clinical Application. *Current Drug Metabolism.* 2007; 8: 383-94.
- Sathoh M, Nejad FM, Ohtani H, Ito A, Ohyama C, Saito S, Orikasa S, Hakomori S. Association of renal cell carcinoma antigen, disialylgalactosylgloboside, with c-Src and Rho A in clustered domains at the surface membrane. *Int J Oncol.* 2000; 16(3): 529-36.

- Sawai H, Okada Y, Funahashi H, Matsuo Y, Takahashi H, Takeyama H, Manabe T. Activation of focal adhesion kinase enhances the adhesion and invasion of pancreatic cancer cells via extracellular signal-regulated kinase-1/2 signaling pathway activation. *Mol Canc.* 2005; 4: 37.
- Sawhney RS, Cookson MM, Omar Y, Hauser J, Brattain MG. Integrin alpha2-mediated ERK and calpain activation play a critical role in cell adhesion and motility via focal adhesion kinase signaling: identification of a novel signaling pathway. *J Biol Chem.* 2006; 281: 8497-510.
- Shen MR, Chou CY, Ellory JC. Swelling-activated taurine and K⁺ transport in human cervical cancer cells: association with cell cycle progression. *Eur J Physiol.* 2001; 441: 787-95.
- Shen WT, Wong TS, Chung WY, Wong MG, Kebebew E, Duh QY, Clark OH. Valproic acid inhibits growth, induces apoptosis, and modulates apoptosis-regulatory and differentiation gene expression in human thyroid cancer cells. *Surgery.* 2005; 138(6): 979-84.
- Shen YC, Hu FC, Jeng YM, Chang YT, Lin ZZ, Chang MC, Hsu C, Cheng AL. Nuclear overexpression of mitotic regulatory proteins in biliary tract cancer: correlation with clinicopathologic features and patient survival. *Canc Epidemiol Biomarkers Prev.* 2009; 18(2): 417-23.
- Shi Q, Bao S, Song L, Wu Q, Bigner DD, Hjelmeland Ab, Rich JN. Targeting SPARC expression decreases glioma cellular survival and invasion associated with reduced activities of FAK and ILK kinases. *Oncogene.* 2007, 26: 4084-94.
- Shin Lee J, Seok Kim H, Bok Kim Y, Cheol Lee M, Soo Park C. Expression of PTEN in renal cell carcinoma and its relation to tumor behavior and growth. *J Surg Oncol.* 2003; 84(3): 166-72.
- Skalski M, Coppolino MG. SNARE-mediated trafficking of alpha5beta1 integrin is required for spreading in CHO cells. *Biochem Biophys Res Commun.* 2005; 335: 1199-210.
- Sokolov DI, Solodovnikova NG, Pavlov OV, Niauri DA, Volkov NN, Sel'kov SA. Study of cytokine profile and angiogenic potential of peritoneal fluid in patients with external genital endometriosis. *Bull Exp Biol Med.* 2005; 140(5): 541-4.
- Song WK, Wang W, Foster RF, Bielser DA, Kaufman SJ. H36- α 7 is a novel integrin alpha chain that is developmentally regulated during skeletal myogenesis. *J Cell Biol.* 1992; 117: 643-57.

- Sourbier C, Lindner V, Lang H, Agouni A, Schordan E, Danilin S, Rothhut S, Jacqmin D, Helwig JJ, Massfelder T. The phosphoinositide 3-kinase/Akt pathway: a new target in human renal cell carcinoma therapy. *Canc Res.* 2006; 66: 5130-42.
- Stadler WM. Targeted agents for the treatment of advanced renal cell carcinoma. *Canc.* 2005; 104(11): 2323-33.
- Staehler M, Rohrmann K, Haseke N, Stief CG, Siebels M. Targeted agents for the treatment of advanced renal cell carcinoma. *Curr Drug Targets.* 2005; 6(7): 835-46.
- Stassar MJ, Devitt G, Brosius M, Rinnab L, Prang J, Schradin T, Simon J, Petersen S, Kopp-Schneider A, Zöller M. Identification of human renal cell carcinoma associated genes by suppression subtractive hybridization. *Br J Cancer.* 2001; 85(9): 1372-82.
- Takai N, Desmond JC, Kumagai T, Gui D, Said JW, Whittaker S, Miyakawa I, Koeffler HP. Histone deacetylase inhibitors have a profound antigrowth activity in endometrial cancer cells. *Clin Canc Res.* 2004; 10(3): 1141-9.
- Takai N, Kawamata N, Gui D, Said JW, Miyakawa I, Koeffler HP. Human ovarian carcinoma cells: histone deacetylase inhibitors exhibit antiproliferative activity and potently induce apoptosis. *Canc.* 2004a; 101(12): 2760-70.
- Takaki T, Echalié A, Brown NR, Hunt T, Endicott JA, Noble ME. The structure of CDK4/cyclin D3 has implications for models of CDK activation. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009; 106(11): 4171-6.
- Takaki T, Fukasawa K, Suzuki-Takahashi I, Hirai H. Cdk-mediated phosphorylation of pRB regulates HDAC binding in vitro. *Biochem Biophys Res Commun.* 2004; 316(1): 252-5.
- Talos F, Nemajerova A, Flores ER, Petrenko O, Moll UM. p73 suppresses polyploidy and aneuploidy in the absence of functional p53. *Mol Cell.* 2007; 27: 647-59.
- Tamaskar I, Garcia JA, Elson P, Wood L, Mekhail T, Dreicer R, Rini BI, Bukowski RM. Antitumor effects of sunitinib or sorafenib in patients with metastatic renal cell carcinoma who received prior antiangiogenic therapy. *J Urol.* 2008; 179(1): 81-6.
- Tanabe T, Shimoda M, Soeno T, Suzuki M, Tajima M, Sato H. Molecular cloning and sequence analysis of feline interferon-stimulated gene 15. *Vet Immunol Immunopathol.* 2008; 126: 20-6.
- Tanabe K, Campbell SC, Alexander JP, Steinbach F, Edinger MG, Tubbs RR, Novick AC, Klein EA. Molecular regulation of intercellular adhesion molecule 1 (ICAM-1) expression in renal cell carcinoma. *Urol Res.* 1997; 25(4): 231-8.

- Tang R, Faussat AM, Majdak P, Perrot JY, Chaoui D, Legrand O, Marie JP. Valproic acid inhibits proliferation and induces apoptosis in acute myeloid leukemia cells expressing P-gp and MRP1. *Leukemia*. 2004; 18: 1246-51.
- Tang Y, Simoneau AR, Liao WX, Yi G, Hope C, Liu F, Li S, Xie J, Holcombe RF, Journak FA, Mercola D, Hoang BH, Zi X. WIF1, a Wnt pathway inhibitor, regulates SKP2 and c-myc expression leading to G1 arrest and growth inhibition of human invasive urinary bladder cancer cells. *Mol Canc Ther*. 2009; 8(2): 458-68.
- Tavares TS, Nanus D, Yang XJ, Gudas LJ. Gene microarray analysis of human renal cell carcinoma: the effects of HDAC inhibition and retinoid treatment. *Canc Biol Ther*. 2008; 7: 1607-18.
- Thamilselvan V, Craig DH, Basson MD. FAK association with multiple signal proteins mediates pressure-induced colon cancer cell adhesion via a Src-dependent PI3K/Akt pathway. *FASEB J*. 2007; 21: 1730-41.
- Tochizawa S, Masumori N, Yanai Y, Ohmoto Y, Yabuuchi Y, Tsukamoto T. Antitumor effects of a combination of interferon-alpha and sorafenib on human renal carcinoma cell lines. *Biomedical Res*. 2008; 29(6): 271-8.
- Tosato G. Interferon-alpha is implicated in the transcriptional regulation of vascular endothelial growth factor. *J Natl Canc Inst*. 2003; 95: 420-1.
- Trus MR, Yang L, Suarez Saiz F, Bordeleau L, Jurisica I, Minden MD. The histone deacetylase inhibitor valproic acid alters sensitivity towards all-trans retinoic acid in acute myeloblastic leukemia cells. *Leukemia*. 2005; 19: 1161-68.
- Tsutsumida H, Swanson BJ, Singh PK, Caffrey TC, Kitajima S, Goto M, Yonezawa S, Hollingsworth MA. RNA interference suppression of MUC1 reduces the growth rate and metastatic phenotype of human pancreatic cancer cells. *Clin Canc Res*. 2006; 12: 2976-87.
- Tye SL, Gilg AG, Tolliver LB, Wheeler WG, Toole BP, Maria BL. Hyaluronan Regulates Ceruloplasmin Production By Gliomas and Their Treatment-Resistant Multipotent Progenitors. *J Child Neurol*. 2008; 23(10): 1221-30.
- Valentini A, Gravina P, Federici G, Bernardini S. Valproic acid induces apoptosis, p16INK4 upregulation and sensitization to chemotherapy in human melanoma cells. *Canc Biol Ther*. 2007; 6: 185-91.
- Vieu E, Lucas C, Romagne F, Escudier B, Chouaib S, Caignard A. Chemokine receptors expression and migration potential of tumor-infiltrating and peripheral-expanded Vgamma9Vdelta2 T cells from renal cell carcinoma patients. *J Immunother*. 2008; 31(3): 313-23.

- von Marschall Z, Scholz A, Cramer T, Schafer G, Schirner M, Oberg K, Wiedenmann B, Hocker M, Rosewicz. Effects of interferon alpha on vascular endothelial growth factor gene transcription and tumor angiogenesis. *J Natl Canc Inst.* 2003; 95: 437-48.
- Wang C, Fu M, Mani S, Wadler S, Senderowicz AM, Pestell RG. Histone acetylation and the cell-cycle in cancer. *Front Biosci.* 2001; 6: 610-29.
- Wang LG, Liu XM, Fang Y, Dai W, Chiao FB, Puccio GM, Feng J, Liu D, Chiao JW. De-repression of the p21 promoter in prostate cancer cells by an isothiocyanate via inhibition of HDACs and c-Myc. *Int J Oncol.* 2008; 33(2): 375-80.
- Wang XF, Qian DZ, Ren M, Kato Y, Wei Y, Zhang L, Fansler Z, Clark D, Nakanishi O, Pili R. Epigenetic modulation of retinoic acid receptor beta 2 by the histone deacetylase inhibitor MS-275 in human renal cell carcinoma. *Clin Canc Res.* 2005; 11(9): 3535-42.
- Weber CR, Nalle SC, Tretiakova M, Rubin DT, Turner JR. Claudin-1 and claudin-2 expression is elevated in inflammatory bowel disease and may contribute to early neoplastic transformation. *Lab Invest.* 2008; 88(10): 1110-20.
- Wedel SA, Sparatore A, Soldato PD, Al-Batran SE, Atmca A, Juengel E, Hudak L, Jonas D, Blaheta RA. New histone deacetylase inhibitors as potential therapeutic tools for advanced prostate carcinoma. 2008; 12(6): 2457-66.
- Welser JV, Lange ND, Flintoff-Dye N, Burkin HR, Burkin DJ. Placental defects in alpha7 integrin null mice. *Placenta.* 2007; 28: 1219-28.
- Welser JV, Lange N, Singer CA, Elorza M, Scowen P, Keef KD, Gerthoffer WT, Burkin DJ. Loss of the $\alpha 7$ Integrin Promotes Extracellular Signal-Regulated Kinase Activation and Altered Vascular Remodeling. *Circ Res.* 2007a; 101(7): 672-81.
- Whiting D, Hsieh G, Yun JJ, Banerji A, Yao W, Fishbein MC, Belperio J, Strieter RM, Bonavida B, Ardehali A. Chemokine monokine induced by IFN-gamma/CXC chemokine ligand 9 stimulates T lymphocyte proliferation and effector cytokine production. *J Immunol.* 2004; 172(12): 7417-24.
- Wilson AJ, Byun DS, Popova N, Murray LB, L'Italien K, Sowa Y, Arango D, Velcich A, Augenlicht LH, Mariadason JM. Histone deacetylase 3 (HDAC3) and other class I HDACs regulate colon cell maturation and p21 expression and are deregulated in human colon cancer. *J Biol Chem.* 2006; 281: 13548-58.
- Windhorst S, Blechner C, Lin HY, Elling C, Nalaskowski M, Kirchberger T, Guse AH, Mayr GW. Ins(1,4,5)P 3-kinase-A overexpression induces cytoskeletal reorganization via a kinase-independent mechanism. *Biochem J.* 2008; 414(3): 407-17.

- Winterwood NE, Varzavand A, Meland MN, Ashman LK, Stipp CS. A critical role for tetraspanin CD151 in $\alpha 3\beta 1$ and $\alpha 6\beta 4$ integrin-dependent tumor cell functions on laminin-5. *Mol Biol Cell*. 2006; 17:2707-21.
- Wong CC, Wong CM, Tung EK, Man K, Ng IO. Rho-kinase 2 is frequently overexpressed in hepatocellular carcinoma and involved in tumor invasion. *Hepatology*. 2009; 49(5): 1583-94.
- Wu J, Grunstein M. 25 Years after the chromosome model: chromatin modifications. *Trends Biochem Sci*. 2000; 25: 619-23.
- Wu ST, Sun GH, Hsieh DS, Chen A, Chen HI, Chang SY, Yu D. Correlation of CD44v5 expression with invasiveness and prognosis in renal cell carcinoma. *J Formos Med Assoc*. 2003; 102(4): 229-33.
- Wu XX, Zeng Y, Jin XH, Kakehi Y. Enhanced susceptibility of adriamycin-treated human renal cell carcinoma cells to lysis by peripheral blood lymphocytes and tumor infiltrating lymphocytes. *Oncol Rep*. 2007; 18(2): 353-9.
- Xia Q, Sung J, Chowdhury W, Chen CL, Hoti N, Shabbeer S, Carducci M, Rodriguez R. Chronic administration of valproic acid inhibits prostate cancer cell growth in vitro and in vivo. *Canc Res*. 2006; 66: 7237-44.
- Xia Z, Dickens M, Raingeaud J, Davis RJ, Greenberg ME. Opposing effects of ERK and JNK-p38 MAP kinases on apoptosis. *Science*. 1995; 270: 1326-31.
- Xin S, Huixin C, Benchang S, Aiping B, Jinhui W, Xiaoyan L, Yu WB, Minhu C. Expression of Cdx2 and claudin-2 in the multistage tissue of gastric carcinogenesis. *Oncology*. 2007; 73: 357-65.
- Xu QY, Gao Y, Liu Y, Yang WZ, Xu XY. Identification of differential gene expression profiles of radioresistant lung cancer cell lines established by fractionated ionizing radiation in vitro. *Chin Med J*. 2008; 121(18): 1830-7.
- Xu Y, Voelter-Mahlknecht S, Mahlkecht U. The histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid down-regulates expression levels of Bcr-abl, c-Myc and HDAC3 in chronic myeloid leukemia cell lines. *Int J Mol Med*. 2005; 15(1): 169-72.
- Yamamoto-Yamaguchi Y, Okabe-Kado J, Kasukabe T, Homma Y. Induction of apoptosis by combined treatment with differentiation-inducing agents and interferon-alpha in human lung cancer cells. *Anticanc Res*. 2003; 18: 1409-14.
- Yang JC, Haworth L, Sherry RM, Hwu P, Schwartzentruber DJ, Topalian SL, Steinberg SM, Chen HX, Rosenberg SA. A randomized trial of bevacizumab, an anti-vascular endothelial growth factor antibody, for metastatic renal cancer. *N Engl J Med*. 2003; 349(5): 427-34.

- Yang K, Handorean AM, Iczkowski KA. MicroRNAs 373 and 520c Are Downregulated in Prostate Cancer, Suppress CD44 Translation and Enhance Invasion of Prostate Cancer Cells in vitro. *Int J Clin Exp Pathol.* 2009; 2(4): 361-9.
- Yuan J, Shi GX, Shao Y, Dai G, Wei JN, Chang DC, Li CJ. Calmodulin bound to stress fibers but not microtubules involves regulation of cell morphology and motility. *Int J Biochem Cell Biol.* 2008; 40(2): 284-93.
- Zeng ZZ, Jia Y, Hahn NJ, Markwart SM, Rockwood KF, Livant DL. Role of focal adhesion kinase and phosphatidylinositol 3'-kinase in integrin fibronectin receptor-mediated, matrix metalloproteinase-1-dependent invasion by metastatic prostate cancer cells. *Canc Res.* 2006; 66: 8091-9.
- Zhang Z, Yamashita H, Toyama T, Sugiura H, Ando Y, Mita K, Hamaguchi M, Hara Y, Kobayashi S, Iwase H. Quantitation of HDAC1 mRNA expression in invasive carcinoma of the breast. *Breast Canc Res.* 2005; 94: 11-16.
- Zhang Z, Yamashita H, Toyama T, Sugiura H, Omoto Y, Ando Y, Mita K, Hamaguchi M, Hayashi S, Iwase H. HDAC6 expression is correlated with better survival in breast cancer. *Clin Canc Res.* 2004; 10: 6962-8.
- Zhu P, Martin E, Mengwasser J, Schlag P, Janssen KP, Gottlicher M. Induction of HDAC2 expression upon loss of APC in colorectal tumorigenesis. *Canc Cell.* 2004; 5: 455-63.
- Zubia A, Ropero S, Otaegui D, Ballestar E, Fraga MF, Boix-Chornet M, Berdasco M, Martinez A, Coll-Mulet L, Gil J, Cossío FP, Esteller M. Identification of (1H)-pyrroles as histone deacetylase inhibitors with antitumoral activity. *Oncogene.* 2009; 28(11): 1477-84.

www-links:

- www.cancer.gov/cancertopics/types/kidney. National Cancer Institute, U.S. National Institute of Health. Kidney Cancer. Stand: 2008.
- www.rki.de/clin_100/nn_203954/DE/Content/GBE/DachdokKrebs/krebs__node.html?__nnn=true. Robert Koch-Institut und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e. V. Dachdokumentation Krebs. Stand: 19.02.2008.
- www.urologenportal.de/nierenzellkarzinom.html. Urologenportal. Das Nierenzellkarzinom. Stand: 19.12.2006.

8 Anhang

8.1 Microarray - unsupervised Analyse

Korrelation

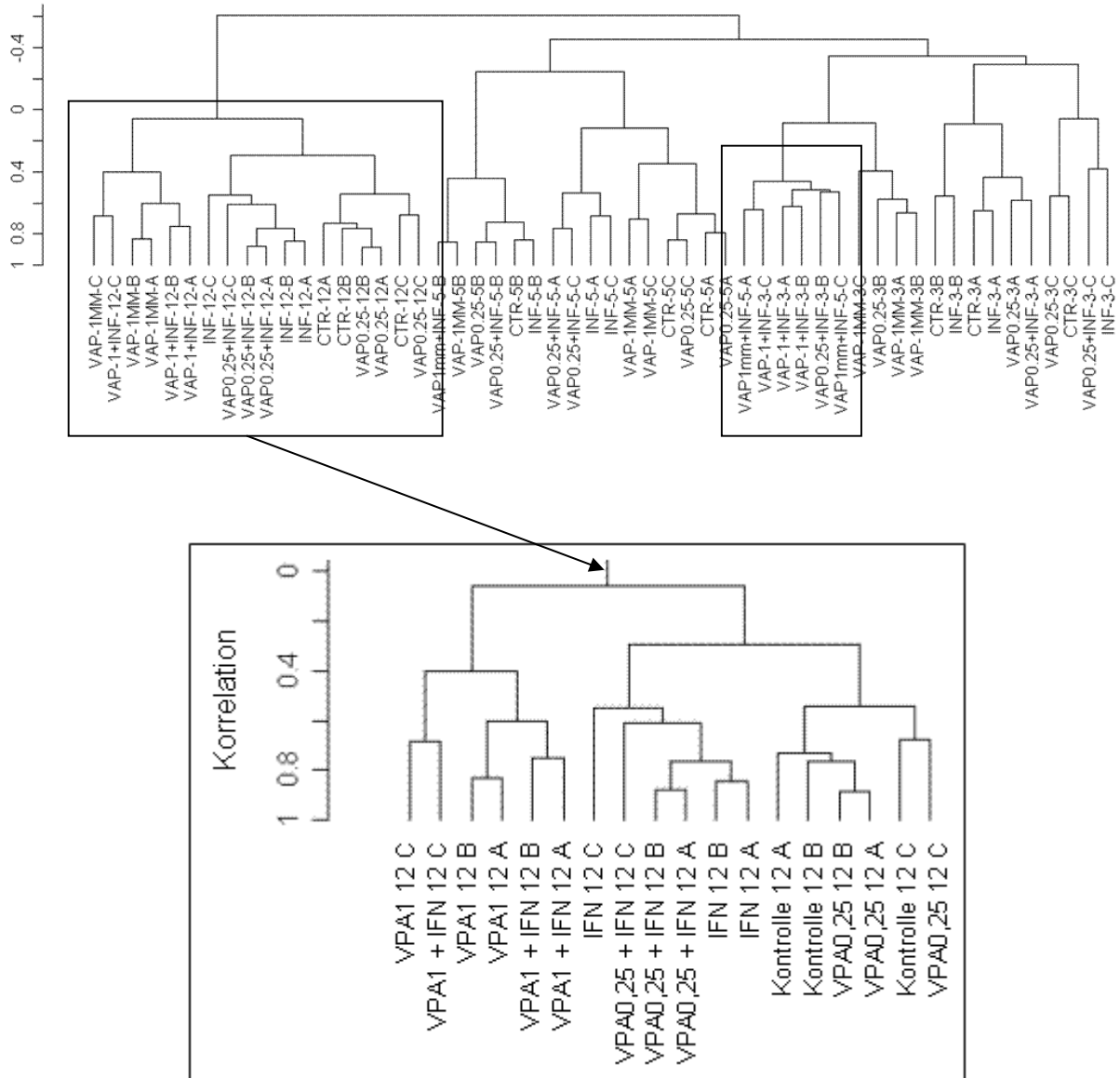


Abbildung 28: Korrelation zwischen den Genprofilen behandelter Caki-1 aus den 3 Sets (A, B, C): Dargestellt in Form *unsupervised Cluster* im Dendrogramm. **Oberes Dendrogramm:** *Cluster* aller 3 Behandlungszeitpunkte (12 Stunden = 12, 3 und 5 Tage = 3 bzw. 5). Gute Korrelation zwischen den Proben der einzelnen Zeitpunkte. Besonders innerhalb der 12 Stunden Gruppe sehr homogene *Cluster*bildung. **Unteres Dendrogramm:** Ausschnitt des 12 Stunden-*Clusters*. VPA1 = VPA 1 mM, IFN = IFN-alpha 200 U/ml, VPA0,25 = VPA 0,25 mM. Innerhalb des 12 Stunden-*Cluster* 3 kleinere *Cluster*, die sich von rechts nach links wie folgt aufteilen: 1: Kontrollen und VPA 0,25 mM, 2: IFN-alpha und VPA 0,25 mM + IFN-alpha, 3: VPA 1 mM und VPA 1 mM + IFN-alpha. Daraus folgt: Innerhalb des 12 Stunden *Clusters* besteht eine sehr gute Korrelation zwischen den Proben der 3 Sets.

Mittels der Daten der Expressionsprofile wurden in der *unsupervised* Analyse Dendrogramme erstellt. Die Dendrogramme reflektieren Expressions-Übereinstimmungen innerhalb der unterschiedlichen Proben (A, B und C). Hierarchische *Cluster* geben Auskunft über die Korrelation und Verknüpfung zwischen den Proben (Abb. 28). Im oberen Dendrogramm wurden alle drei Sets aller Proben (A, B und C) zu den genannten drei Zeitpunkten aufgeführt. Es bildeten sich drei Haupt-*Cluster* heraus, die weitestgehend die drei verschiedenen Behandlungszeiträume, 12 Stunden, 3 und 5 Tage widerspiegelten. Interessanterweise befanden sich die Proben nach kombinierter 3- und 5-tägiger (A & C) Applikation mit VPA 1 mM und IFN-alpha in dem gleichen Unter-*Cluster* (Abb. 28, oben, Rahmen rechts). Hier lag demnach eine Behandlungszeit-unabhängige gute Korrelation zwischen den mit VPA 1 mM und IFN-alpha behandelten Proben vor. Von dieser Ausnahme abgesehen, blieben die Proben der unterschiedlichen Behandlungszeiträume unter sich. Innerhalb dieser drei Haupt-*Cluster* waren jedoch Behandlungs-spezifische Unter-*Cluster* zu beobachten, besonders deutlich nach 12-stündiger Applikation. So ließen sich bei genauerer Betrachtung des 12 Stunden-*Clusters* drei weitere Unter-*Cluster* nachweisen (Abb. 28, unten). Diese drei *Cluster* bestanden aus (von rechts nach links) 1: den Kontrollen und den Proben, die mit VPA 0,25 mM, 2: den Proben, die mit IFN-alpha und der korrespondierenden Kombination mit VPA 0,25 mM behandelt wurden, sowie 3: den Proben, denen VPA 1 mM und die entsprechende Kombination mit IFN-alpha appliziert wurde. Zwischen den Proben der drei unabhängigen Sets bestand damit eine sehr gute Applikations-induzierte Korrelation.

8.2 Microarray - Datentabellen

Microarray: 12 Stunden + VPA + IFN-alpha

ID	Gensymbol	Gentitel	INF	0,25	0,25+	1	1+
209459_s_at	ABAT	4-aminobutyrate aminotransferase				6,6	5,4
209460_at	ABAT	4-aminobutyrate aminotransferase				9,9	9,5
224339_s_at	ANGPTL1	angiopoietin-like 1	15,2				
231773_at	ANGPTL1	angiopoietin-like 1	10,0		6,0		
221009_s_at	ANGPTL4	angiopoietin-like 4		2,3	2,6	3,9	6,1
227015_at	ASPHD2	aspartate beta-hydroxylase domain containing 2			3,9	3,4	5,6
228439_at	BATF2	basic leucine zipper transcription factor, ATF-like 2	15,3		22,4		22,2
207326_at	BTC	betacellulin	7,5		5,8		
241412_at	BTC	betacellulin	6,8		5,5		2,5
230033_at	C19orf51	chromosome 19 open reading frame 51				5,1	5,7
207571_x_at	C1orf38	chromosome 1 open reading frame 38	3,1		4,7		7,2
210785_s_at	C1orf38	chromosome 1 open reading frame 38			4,8		8,2
232000_at	C9orf52	Chromosome 9 open reading frame 52					5,1
216598_s_at	CCL2	chemokine (C-C motif) ligand 2	9,5		6,0		
219500_at	CLCF1	cardiotrophin-like cytokine factor 1		-1,9	-2,0	-6,1	-5,1
205538_at	CORO2A	coronin, actin binding protein, 2A				4,5	5,9
227177_at	CORO2A	Coronin, actin binding protein, 2A				3,7	5,7
210229_s_at	CSF2	colony stimulating factor 2 (granulocyte-macrophage)	11,8				
204533_at	CXCL10	chemokine (C-X-C motif) ligand 10	79,0		39,7		10,6
210163_at	CXCL11	chemokine (C-X-C motif) ligand 11	73,6		46,4		16,5
211122_s_at	CXCL11	chemokine (C-X-C motif) ligand 11	89,2		56,1		17,9
223454_at	CXCL16	chemokine (C-X-C motif) ligand 16	5,1		4,3		2,8
207850_at	CXCL3	chemokine (C-X-C motif) ligand 3	8,3				
205073_at	CYP2J2	cytochrome P450, family 2, subfamily J, polypeptide 2	5,1		4,7		2,6

228228_at	DACT3	dapper, antagonist of beta-catenin, homolog 3 (Xenopus laevis)				6,0	6,5
218943_s_at	DDX58	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58	14,0		13,7		10,5
222793_at	DDX58	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58	12,1		13,2		10,3
242961_x_at	DDX58	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58	10,2		11,2		9,7
224966_s_at	DUS3L	dihydrouridine synthase 3-like (S. cerevisiae)		-1,9	-1,6	-5,1	-4,1
217497_at	ECGF1	endothelial cell growth factor 1 (platelet-derived)	5,6		4,8		3,7
227803_at	ENPP5	ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 5 (putative function)		3,3	2,6	5,7	5,6
237054_at	ENPP5	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 5 (putative function)		4,4		7,4	8,0
227609_at	EPST11	epithelial stromal interaction 1 (breast)	17,9		19,0		14,2
235276_at	EPST11	Epithelial stromal interaction 1 (breast)	12,6		14,2		12,1
202269_x_at	GBP1	guanylate binding protein 1, interferon-inducible, 67kDa	7,3		7,4		5,8
202270_at	GBP1	guanylate binding protein 1, interferon-inducible, 67kDa	6,2		6,7		5,2
231577_s_at	GBP1	guanylate binding protein 1, interferon-inducible, 67kDa	6,0		5,9		4,3
235574_at	GBP4	guanylate binding protein 4	5,9		5,4		2,2
219863_at	HERC5	hect domain and RLD 5	6,9		8,9		10,4
219352_at	HERC6	hect domain and RLD 6	14,3	-1,9	8,3	-6,4	3,0
209417_s_at	IFI35	interferon-induced protein 35	5,7	-1,3	5,1	-1,6	3,7
214059_at	IFI44	Interferon-induced protein 44	6,8		7,7		8,1
214453_s_at	IFI44	interferon-induced protein 44	6,6		6,6	-1,8	5,6
204439_at	IFI44L	interferon-induced protein 44-like	8,8		7,2	-3,2	4,7

204415_at	IFI6	interferon, alpha-inducible protein 6	9,8		8,8		8,1
219209_at	IFIH1	interferon induced with helicase C domain 1	12,2		11,4		9,0
203153_at	IFIT1	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	23,2		22,0		19,4
217502_at	IFIT2	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2	17,3		13,8		8,1
226757_at	IFIT2	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 2	13,8		12,1	-1,6	6,6
204747_at	IFIT3	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	16,2		14,6	-2,4	10,8
229450_at	IFIT3	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	9,6		8,7	-2,4	7,3
201601_x_at	IFITM1	interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)	10,5		9,0		6,4
214022_s_at	IFITM1	interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)	10,3		9,1		6,0
222868_s_at	IL18BP	interleukin 18 binding protein	10,9		6,7		
230966_at	IL411	interleukin 4 induced 1	7,8		5,8	-2,9	2,5
205207_at	IL6	interleukin 6 (interferon, beta 2)	6,3		4,1		
202859_x_at	IL8	interleukin 8	6,9		3,5	-1,9	
211506_s_at	IL8	interleukin 8	8,8		3,8		
210029_at	INDO	indoleamine-pyrrole 2,3 dioxygenase	21,5		16,7		8,1
208436_s_at	IRF7	interferon regulatory factor 7	6,8	-1,7	6,8	-1,7	5,1
205483_s_at	ISG15	ISG15 ubiquitin-like modifier	14,2		14,3		12,5
204698_at	ISG20	interferon stimulated exonuclease gene 20kDa	28,5		22,5		13,6
33304_at	ISG20	interferon stimulated exonuclease gene 20kDa	20,4		16,7		10,1
203130_s_at	KIF5C	kinesin family member 5C				13,6	13,8

205569_at	LAMP3	lysosomal-associated membrane protein 3	9,2		7,5		4,6
218219_s_at	LANCL2	LanC lantibiotic synthetase component C-like 2 (bacterial)		-2,2	-2,3	-5,9	-5,7
222561_at	LANCL2	LanC lantibiotic synthetase component C-like 2 (bacterial)		-1,9	-1,7	-6,1	-5,0
203236_s_at	LGALS9	lectin, galactoside-binding, soluble, 9 (galectin 9)	48,4		42,0		20,5
219364_at	LGP2	likely ortholog of mouse D11lgp2	5,3		4,9		3,7
226702_at	LOC129607	hypothetical protein LOC129607	23,8		22,6	-3,1	18,1
219211_at	LOC727996 /// LOC728216 /// LOC728438 /// USP18	ubiquitin specific peptidase 18 /// similar to ubiquitin specific peptidase 18	9,4		8,6		7,0
213013_at	MAPK8IP1	mitogen-activated protein kinase 8 interacting protein 1				7,1	7,1
225379_at	MAPT	microtubule-associated protein tau		3,6		6,3	7,0
227909_at	MGC39606	hypothetical protein MGC39606				5,5	5,1
202086_at	MX1	myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78 (mouse)	11,2		11,1	-3,6	8,4
204994_at	MX2	myxovirus (influenza virus) resistance 2 (mouse)	31,6		28,2		19,6
235367_at	MYPN	myopalladin				-5,1	-6,0
226474_at	NLRC5	NLR family, CARD domain containing 5	4,2		4,8		5,0
218380_at	NLRP1	NLR family, pyrin domain containing 1		3,8	3,3	7,3	9,1
202869_at	OAS1	2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa	11,1		12,0		11,0
205552_s_at	OAS1	2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa	10,8		12,0		9,4
204972_at	OAS2	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa	14,6		12,2		7,4

206553_at	OAS2	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa	14,2		12,2		6,6
228607_at	OAS2	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa	21,7		21,0		13,0
218400_at	OAS3	2'-5'-oligoadenylate synthetase 3, 100kDa	10,6		9,7	-2,0	6,4
232666_at	OAS3	2'-5'-oligoadenylate synthetase 3, 100kDa	6,8		6,6		4,3
205660_at	OASL	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like	13,1		14,3		17,2
210797_s_at	OASL	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like	13,8		15,6		18,1
223220_s_at	PARP9	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 9	4,9		5,7		5,0
227807_at	PARP9	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 9	5,2		5,9		4,1
205226_at	PDGFRL	platelet-derived growth factor receptor-like	8,4	1,8	8,7	1,7	7,6
226459_at	PIK3AP1	phosphoinositide-3-kinase adaptor protein 1	5,2	1,5	6,4		5,4
236302_at	PPM1E	protein phosphatase 1E (PP2C domain containing)					10,3
228230_at	PRIC285	peroxisomal proliferator-activated receptor A interacting complex 285	8,6		9,8		8,1
205801_s_at	RASGRP3	RAS guanyl releasing protein 3 (calcium and DAG-regulated)	35,1		40,1		
213797_at	RSAD2	radical S-adenosyl methionine domain containing 2	120,5		102,4		63,1
242625_at	RSAD2	radical S-adenosyl methionine domain containing 2	64,8		55,0		34,5
219684_at	RTP4	receptor (chemosensory) transporter protein 4	5,4		4,7	-3,0	3,2
219691_at	SAMD9	sterile alpha motif domain containing 9	7,4		9,4		8,0
228531_at	SAMD9	sterile alpha motif domain containing 9	7,6		8,5		7,8

226603_at	SAMD9L	sterile alpha motif domain containing 9-like	7,8		6,2	-1,6	3,3
230036_at	SAMD9L	sterile alpha motif domain containing 9-like	11,0		8,3		4,4
235643_at	SAMD9L	sterile alpha motif domain containing 9-like	12,3		8,6		3,5
204502_at	SAMHD1	SAM domain and HD domain 1	6,9		7,4	1,6	5,4
213716_s_at	SECTM1	secreted and transmembrane 1	4,1		5,1		4,7
200986_at	SERPING1	serpin peptidase inhibitor, clade G (C1 inhibitor), member 1, (angioedema, hereditary)			7,8		
205637_s_at	SH3GL3	SH3-domain GRB2-like 3				7,0	6,4
219593_at	SLC15A3	solute carrier family 15, member 3	8,2		6,2		3,3
208012_x_at	SP110	SP110 nuclear body protein	4,3		5,3		5,0
208392_x_at	SP110	SP110 nuclear body protein	3,8		5,2		5,0
209761_s_at	SP110	SP110 nuclear body protein	4,3		5,2		4,7
209762_x_at	SP110	SP110 nuclear body protein	5,2		6,2		6,1
223980_s_at	SP110	SP110 nuclear body protein	5,7		8,1		8,9
218999_at	TMEM140	transmembrane protein 140	4,0		5,0	2,0	6,5
237166_at	TMEPAI	Transmembrane, prostate androgen induced RNA				18,9	19,2
223501_at	TNFSF13B	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b	15,4		14,8		8,5
223502_s_at	TNFSF13B	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b	19,8		17,4		9,0
205599_at	TRAF1	TNF receptor-associated factor 1	5,4		3,8		
232792_at	TRIM69	tripartite motif-containing 69					8,9
205890_s_at	UBD	ubiquitin D	6,9		5,7		4,3
206133_at	XAF1	XIAP associated factor-1	9,3		8,4		5,2
228617_at	XAF1	XIAP associated factor-1	10,4		9,9	-2,1	6,6

242234_at	XAF1	XIAP associated factor-1	6,4		4,8		
-----------	------	--------------------------	-----	--	-----	--	--

Tabelle 28: *Microarray*-Daten: Alphabetisch sortiert. 12-stündige Behandlung mit VPA und IFN-alpha. Annotierte Gentranskripte, von denen mindestens eines gegenüber den Kontrollen *fold change* > 5 aufweist. LCB > 1,2. IFN = IFN-alpha (200 U / ml), 0,25 = VPA (0,25 mM), 0,25+ = VPA (0,25 mM) + IFN-apha, 1 = VPA (1 mM), 1+ = VPA (1 mM) + IFN-alpha.

Microarray: 3 Tage + VPA + IFN-alpha

ID	Gensymbol	Gentitel	INF	0,25	0,25+	1	1+
205477_s_at	AMBP	alpha-1-microglobulin/bikunin precursor				-5,1	-8,7
209462_at	APLP1	amyloid beta (A4) precursor-like protein 1		3,4	3,4	6,1	6,6
206561_s_at	AKR1B10	aldo-keto reductase family 1, member B10 (aldose reductase)			-3,8	-3,2	-8,1
228439_at	BATF2	basic leucine zipper transcription factor, ATF-like 2	11,1		13,9		14,5
232456_at	C10orf71	chromosome 10 open reading frame 71	10,0		12,3		11,3
230033_at	C19orf51	chromosome 19 open reading frame 51			2,8	5,5	5,2
207571_x_at	C1orf38	chromosome 1 open reading frame 38	3,2		4,2	2,0	5,1
210785_s_at	C1orf38	chromosome 1 open reading frame 38	2,8		4,6		5,0
238383_at	C6orf58	chromosome 6 open reading frame 58					9,3
230706_s_at	CAMK2N2	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 2				6,2	6,0
211368_s_at	CASP1	caspase 1, apoptosis-related cysteine peptidase (interleukin 1, beta, convertase)				-6,0	
1405_i_at	CCL5	chemokine (C-C motif) ligand 5		-2,6		-5,4	-2,6
209395_at	CHI3L1	chitinase 3-like 1 (cartilage glycoprotein-39)				-15,3	-19,1
212624_s_at	CHN1	chimerin (chimaerin) 1		2,8	3,1	4,0	5,1
223509_at	CLDN2	claudin 2				-4,0	-9,2
205830_at	CLGN	calmegin		2,8	3,4	4,6	6,0
227202_at	CNTN1	Contactin 1		5,8		12,3	6,6
227209_at	CNTN1	Contactin 1		4,1	2,7	7,9	4,8
239921_at	COL28A1	collagen, type XXVIII, alpha 1					11,7
242345_at	COL28A1	collagen, type XXVIII, alpha 1		3,2	4,3	6,6	7,5
227177_at	CORO2A	Coronin, actin binding protein, 2A			4,1	4,3	8,2
204846_at	CP	ceruloplasmin (ferroxidase)					-34,1

227253_at	CP	ceruloplasmin (ferroxidase)				-12,4	-26,0
228228_at	DACT3	dapper, antagonist of beta-catenin, homolog 3 (<i>Xenopus laevis</i>)				9,3	7,8
222793_at	DDX58	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58	5,0		4,7		4,7
214079_at	DHRS2	dehydrogenase/reductase (SDR family) member 2			8,9		10,9
226281_at	DNER	delta/notch-like EGF repeat containing			2,9	5,2	6,2
219896_at	DRD1IP	dopamine receptor D1 interacting protein					49,6
227609_at	EPST11	epithelial stromal interaction 1 (breast)	11,7		11,2		9,3
235276_at	EPST11	Epithelial stromal interaction 1 (breast)	13,0		12,5		10,2
203980_at	FABP4	fatty acid binding protein 4, adipocyte				17,3	26,6
226145_s_at	FRAS1	Fraser syndrome 1		3,7	4,1	8,1	6,4
204471_at	GAP43	growth associated protein 43				6,0	5,6
221902_at	GPR153	G protein-coupled receptor 153		6,2		6,0	7,7
219352_at	HERC6	hect domain and RLD 6	11,3		6,4		5,8
236193_at	HIST1H2BC	histone cluster 1, H2bc		-3,8	-1,9	-6,7	-3,0
214455_at	HIST1H2BC /// HIST1H2BG	histone cluster 1, H2bg /// histone cluster 1, H2bc		-2,7	-2,1	-5,1	-3,0
211990_at	HLA-DPA1	major histocompatibility complex, class II, DP alpha 1			3,8		6,1
201137_s_at	HLA-DPB1	major histocompatibility complex, class II, DP beta 1					15,5
202411_at	IFI27	interferon, alpha-inducible protein 27	9,2		11,0		11,6
214059_at	IFI44	Interferon-induced protein 44	4,3		5,2		4,8
214453_s_at	IFI44	interferon-induced protein 44	7,6		7,5		7,3
204439_at	IFI44L	interferon-induced protein 44-like	10,8		9,3	-3,0	7,3
204415_at	IFI6	interferon, alpha-inducible protein 6	22,7		22,7		24,8

203153_at	IFIT1	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	13,9		11,3		11,3
204747_at	IFIT3	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	7,8		5,6	-3,2	4,6
229450_at	IFIT3	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	5,6	-2,0	4,4	-3,3	3,4
201601_x_at	IFITM1	interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)	22,2		17,3	-6,7	15,4
214022_s_at	IFITM1	interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)	21,2		16,1	-6,2	14,3
206172_at	IL13RA2	interleukin 13 receptor, alpha 2					133,6
221658_s_at	IL21R	interleukin 21 receptor				5,3	6,2
202859_x_at	IL8	interleukin 8	2,3	1,6	3,9	2,3	6,9
211506_s_at	IL8	interleukin 8			3,8	2,1	7,1
208436_s_at	IRF7	interferon regulatory factor 7	5,9	-1,8	5,5	-3,4	4,8
205483_s_at	ISG15	ISG15 ubiquitin-like modifier	11,4		11,9		14,1
216331_at	ITGA7	integrin, alpha 7				10,4	12,6
202746_at	ITM2A	integral membrane protein 2A		8,2	7,5	14,8	17,4
202747_s_at	ITM2A	integral membrane protein 2A		4,0	4,2	8,9	8,5
203129_s_at	KIF5C	kinesin family member 5C				6,4	6,4
203130_s_at	KIF5C	kinesin family member 5C				17,2	17,5
219692_at	KREMEN2	kringle containing transmembrane protein 2				6,7	7,3
203236_s_at	LGALS9	lectin, galactoside-binding, soluble, 9 (galectin 9)	45,2				
226702_at	LOC129607	hypothetical protein LOC129607	28,3		21,6		18,6
231337_at	LOC730124 /// LOC730941	hypothetical protein LOC730124 /// hypothetical protein LOC730941				-8,7	-4,6
238451_at	MPP7	membrane protein, palmitoylated 7 (MAGUK p55 subfamily member 7)				6,9	

202086_at	MX1	myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78 (mouse)	14,8		12,0	-3,6	9,9
204994_at	MX2	myxovirus (influenza virus) resistance 2 (mouse)	32,7		30,4		27,3
209550_at	NDN	neccdin homolog (mouse)					5,7
218380_at	NLRP1	NLR family, pyrin domain containing 1		8,3	6,7	20,4	19,2
204081_at	NRGN	neurogranin (protein kinase C substrate, RC3)					6,8
209230_s_at	NUPR1	nuclear protein 1			-3,0	-3,2	-5,9
202869_at	OAS1	2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa	9,4		10,5		11,4
205552_s_at	OAS1	2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa	9,3		9,7		10,6
204972_at	OAS2	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa	29,8		22,0		15,0
206553_at	OAS2	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa	33,9		26,1		16,8
228607_at	OAS2	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa	14,1		15,7		12,9
218400_at	OAS3	2'-5'-oligoadenylate synthetase 3, 100kDa	11,4		10,7		9,8
232666_at	OAS3	2'-5'-oligoadenylate synthetase 3, 100kDa			5,5		
205660_at	OASL	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like	4,3		4,7		6,2
210797_s_at	OASL	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like	4,7		4,8		6,3
213273_at	ODZ4	odz, odd Oz/ten-m homolog 4 (Drosophila)			94,4		
209791_at	PADI2	peptidyl arginine deiminase, type II		3,2	2,8	5,3	4,8
220779_at	PADI3	peptidyl arginine deiminase, type III		4,4	5,5	7,2	7,8
223220_s_at	PARP9	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 9	5,1		5,2		5,1
218952_at	PCSK1N	proprotein convertase subtilisin/kexin type 1 inhibitor		2,5	2,3	5,5	5,5

210145_at	PLA2G4A	phospholipase A2, group IVA (cytosolic, calcium-dependent)		3,4	4,0	7,1	7,3
236302_at	PPM1E	protein phosphatase 1E (PP2C domain containing)				9,8	9,9
206084_at	PTPRR	protein tyrosine phosphatase, receptor type, R					6,6
210675_s_at	PTPRR	protein tyrosine phosphatase, receptor type, R				6,1	8,8
238353_at	RASL11A	RAS-like, family 11, member A					-7,5
204040_at	RNF144	ring finger protein 144					6,8
241703_at	RPIB9	Rap2-binding protein 9				9,5	10,3
213797_at	RSAD2	radical S-adenosyl methionine domain containing 2	6,7		7,7		10,6
242625_at	RSAD2	radical S-adenosyl methionine domain containing 2	4,8				5,4
223719_s_at	RTBDN	retbindin		8,3	10,6	25,2	27,9
205352_at	SERPINI1	serpin peptidase inhibitor, clade I (neuroserpin), member 1				5,8	8,4
202508_s_at	SNAP25	synaptosomal-associated protein, 25kDa		2,9	3,6	5,0	5,7
225728_at	SORBS2	sorbin and SH3 domain containing 2		3,2	4,2	8,3	8,2
207777_s_at	SP140	SP140 nuclear body protein					5,6
218638_s_at	SPON2	spondin 2, extracellular matrix protein		-2,1	-2,9	-6,2	-6,9
242943_at	ST8SIA4	ST8 alpha-N-acetylneuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 4		2,6	3,7	4,7	5,1
223557_s_at	TMEFF2	transmembrane protein with EGF-like and two follistatin-like domains 2			3,4	6,4	8,2
227345_at	TNFRSF10D	tumor necrosis factor receptor superfamily, member 10d, decoy with truncated death domain	-2,2		-3,3	-2,0	-6,1

223502_s_at	TNFSF13B	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 13b	7,0		4,8		3,3
205742_at	TNNI3	troponin I type 3 (cardiac)				12,8	17,6
203824_at	TSPAN8	tetraspanin 8		-2,8	-4,1	-5,1	-5,2
242162_at	WDR69	WD repeat domain 69		2,9	3,4	6,2	6,5
206133_at	XAF1	XIAP associated factor-1	8,2		6,2		4,9
228617_at	XAF1	XIAP associated factor-1	10,4		6,9		4,2

Tabelle 29: *Microarray*-Daten: Alphabetisch sortiert. 3-tägige Behandlung mit VPA und IFN-alpha. Annotierte Gentranskripte, von denen mindestens eines gegenüber den Kontrollen *fold change* > 5 aufweist. LCB > 1,2. IFN = IFN-alpha (200 U / ml), 0,25 = VPA (0,25 mM), 0,25+ = VPA (0,25 mM) + IFN-apha, 1 = VPA (1 mM), 1+ = VPA (1 mM) + IFN-alpha.

Microarray: 5 Tage + VPA + IFN-alpha

ID	Gensymbol	Gentitel	INF	0,25	0,25+	1	1+
209459_s_at	ABAT	4-aminobutyrate aminotransferase				9,0	
237411_at	ADAMTS6	ADAM metalloproteinase with thrombospondin type 1 motif, 6					7,0
205477_s_at	AMBP	alpha-1-microglobulin/bikunin precursor					-17,2
206029_at	ANKRD1	ankyrin repeat domain 1 (cardiac muscle)				5,2	4,1
209462_at	APLP1	amyloid beta (A4) precursor-like protein 1				6,5	6,4
228439_at	BATF2	basic leucine zipper transcription factor, ATF-like 2	9,5		14,8		16,5
232456_at	C10orf71	chromosome 10 open reading frame 71	8,1		8,4		10,4
228165_at	C12orf53	chromosome 12 open reading frame 53					19,3
230033_at	C19orf51	chromosome 19 open reading frame 51				5,7	6,4
207571_x_at	C1orf38	chromosome 1 open reading frame 38	3,8		4,5	2,3	6,1
210785_s_at	C1orf38	chromosome 1 open reading frame 38	4,9		5,7	3,1	8,2
231838_at	C20orf119	chromosome 20 open reading frame 119				-2,9	-7,0
208451_s_at	C4A /// C4B	complement component 4A (Rodgers blood group) /// complement component 4B (Childo blood group)			-3,1	-4,9	-9,2
214428_x_at	C4A /// C4B	complement component 4A (Rodgers blood group) /// complement component 4B (Childo blood group)				-4,3	-8,1
233504_at	C9orf84	chromosome 9 open reading frame 84				43,8	41,1
230706_s_at	CAMK2N2	calcium/calmodulin-dependent protein kinase II inhibitor 2				4,8	5,9

243805_at	CCBE1	collagen and calcium binding EGF domains 1					7,3
204655_at	CCL5	chemokine (C-C motif) ligand 5	5,4				
223233_s_at	CGN	cingulin					28,3
223737_x_at	CHST9	carbohydrate (N-acetylgalactosamine 4-0) sulfotransferase 9				4,6	5,3
242100_at	CHSY-2	chondroitin synthase-2			2,6	5,5	6,3
220332_at	CLDN16	claudin 16					6,7
223509_at	CLDN2	claudin 2					-9,2
211203_s_at	CNTN1	contactin 1				8,7	6,3
227202_at	CNTN1	Contactin 1				24,2	17,8
227209_at	CNTN1	Contactin 1		3,3	3,0	17,4	14,4
242345_at	COL28A1	collagen, type XXVIII, alpha 1				8,0	11,8
205538_at	CORO2A	coronin, actin binding protein, 2A					7,3
227177_at	CORO2A	Coronin, actin binding protein, 2A				9,4	16,2
204846_at	CP	ceruloplasmin (ferroxidase)					-38,1
201117_s_at	CPE	carboxypeptidase E			3,0	4,8	6,3
208146_s_at	CPVL	carboxypeptidase, vitellogenic-like				4,6	5,6
205489_at	CRYM	crystallin, mu				4,5	5,1
228228_at	DACT3	dapper, antagonist of beta-catenin, homolog 3 (Xenopus laevis)				29,7	30,0
205168_at	DDR2	discoidin domain receptor family, member 2				-17,7	-10,5
225442_at	DDR2	Discoidin domain receptor family, member 2			-10,5	-38,7	-47,1
218943_s_at	DDX58	DEAD (Asp-Glu-Ala-Asp) box polypeptide 58	5,2		4,8		4,3
225275_at	EDIL3	EGF-like repeats and discoidin I-like domains 3				6,8	5,2
207111_at	EMR1	egf-like module containing, mucin-like, hormone receptor-like 1				3,5	7,7
237054_at	ENPP5	Ectonucleotide pyrophosphatase/phosphodiesterase 5 (putative function)			5,4	6,8	7,6
227609_at	EPSTI1	epithelial stromal interaction 1 (breast)	19,3		19,8		21,5

235276_at	EPST11	Epithelial stromal interaction 1 (breast)	114,1		118,8		119,9
203980_at	FABP4	fatty acid binding protein 4, adipocyte					40,1
205973_at	FEZ1	fasciculation and elongation protein zeta 1 (zygin I)					14,5
205014_at	FGFBP1	fibroblast growth factor binding protein 1					81,7
206857_s_at	FKBP1B	FK506 binding protein 1B, 12.6 kDa			3,2	4,8	6,0
221172_at	FLJ21075	hypothetical protein FLJ21075				6,5	8,0
204471_at	GAP43	growth associated protein 43					13,9
216963_s_at	GAP43	growth associated protein 43					7,7
206646_at	GLI1	glioma-associated oncogene homolog 1 (zinc finger protein)				5,5	
209469_at	GPM6A	glycoprotein M6A			3,4	3,9	5,1
239533_at	GPR155	G protein-coupled receptor 155				6,3	
219352_at	HERC6	hect domain and RLD 6	8,5		4,7		4,0
236193_at	HIST1H2BC	histone cluster 1, H2bc		-2,5		-7,1	-3,3
214455_at	HIST1H2BC /// HIST1H2BG	histone cluster 1, H2bg /// histone cluster 1, H2bc		-2,9		-5,1	-2,8
235944_at	HMCN1	hemicentin 1			3,9	7,5	7,8
207826_s_at	ID3	inhibitor of DNA binding 3, dominant negative helix-loop-helix protein					-5,7
202411_at	IFI27	interferon, alpha-inducible protein 27	11,2		13,0		14,2
214059_at	IFI44	Interferon-induced protein 44	7,4		7,0		6,6
214453_s_at	IFI44	interferon-induced protein 44	8,5		7,7		9,2
204439_at	IFI44L	interferon-induced protein 44-like	20,3		19,4		13,1
204415_at	IFI6	interferon, alpha-inducible protein 6	31,6		32,4		37,1
219209_at	IFIH1	interferon induced with helicase C domain 1	6,4		6,4	1,4	6,0
203153_at	IFIT1	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 1	25,7		23,0		24,9

204747_at	IFIT3	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	8,7	-1,6	6,9		6,6
229450_at	IFIT3	interferon-induced protein with tetratricopeptide repeats 3	7,4		6,8		5,6
201601_x_at	IFITM1	interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)	70,2		58,6		43,5
214022_s_at	IFITM1	interferon induced transmembrane protein 1 (9-27)	57,9		50,8	-4,0	36,7
221658_s_at	IL21R	interleukin 21 receptor				10,0	12,3
208436_s_at	IRF7	interferon regulatory factor 7	5,6		5,6	-2,5	4,0
205483_s_at	ISG15	ISG15 ubiquitin-like modifier	14,0		12,9		16,8
213416_at	ITGA4	integrin, alpha 4 (antigen CD49D, alpha 4 subunit of VLA-4 receptor)		2,1		4,6	5,3
216331_at	ITGA7	integrin, alpha 7				8,1	10,4
202746_at	ITM2A	integral membrane protein 2A				9,8	10,0
202747_s_at	ITM2A	integral membrane protein 2A				8,0	7,9
205874_at	ITPKA	inositol 1,4,5-trisphosphate 3-kinase A					-10,9
239787_at	KCTD4	potassium channel tetramerisation domain containing 4		3,7	5,7	8,6	14,8
240512_x_at	KCTD4	potassium channel tetramerisation domain containing 4				6,0	10,4
232155_at	KIAA1618	KIAA1618	2,4		3,8		6,2
203129_s_at	KIF5C	kinesin family member 5C				10,1	6,8
203130_s_at	KIF5C	kinesin family member 5C		5,2		20,2	14,4
219692_at	KREMEN2	kringle containing transmembrane protein 2				27,6	
205569_at	LAMP3	lysosomal-associated membrane protein 3				-4,0	-7,9
221581_s_at	LAT2	linker for activation of T cells family, member 2			3,4	3,7	6,0
203236_s_at	LGALS9	lectin, galactoside-binding, soluble, 9 (galectin 9)	37,3				

232593_at	LINCR	likely ortholog of mouse lung-inducible Neutralized-related C3HC4 RING domain protein	2,8		4,8	2,9	7,2
226702_at	LOC129607	hypothetical protein LOC129607	21,7		16,0		18,1
240293_at	LOC283152	hypothetical protein LOC283152					6,8
229978_at	LOC440338	hypothetical gene supported by AJ002784		1,9	2,9	3,8	5,4
219211_at	LOC727996 /// LOC728216 /// LOC728438 /// USP18	ubiquitin specific peptidase 18 /// similar to ubiquitin specific peptidase 18	6,7		6,1		5,4
218573_at	MAGEH1	melanoma antigen family H, 1				4,4	6,3
227219_x_at	MAP1LC3A	microtubule-associated protein 1 light chain 3 alpha				-3,4	-5,0
227055_at	METTL7B	methyltransferase like 7B		2,9	3,2	7,5	9,5
202086_at	MX1	myxovirus (influenza virus) resistance 1, interferon-inducible protein p78 (mouse)	16,7		14,5	-3,0	12,5
204994_at	MX2	myxovirus (influenza virus) resistance 2 (mouse)	126,4		75,2		81,4
228523_at	NANOS1	nanos homolog 1 (Drosophila)	-3,0	-2,7	-7,0	-3,4	-7,8
209159_s_at	NDRG4	NDRG family member 4				5,7	8,3
203961_at	NEBL	nebulette					-5,9
203962_s_at	NEBL	nebulette					-7,0
207279_s_at	NEBL	nebulette					-5,4
218380_at	NLRP1	NLR family, pyrin domain containing 1		3,3	3,6	10,5	10,7
206023_at	NMU	neuromedin U					5,2
204081_at	NRGN	neurogranin (protein kinase C substrate, RC3)					51,9
210683_at	NRTN	neurturin				6,1	7,3
209230_s_at	NUPR1	nuclear protein 1					-5,3
202869_at	OAS1	2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa	15,4		16,9	1,7	22,1
205552_s_at	OAS1	2',5'-oligoadenylate synthetase 1, 40/46kDa	14,2		15,4		20,5
204972_at	OAS2	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa	41,1		29,9		25,1

206553_at	OAS2	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa	47,6		33,3		26,5
228607_at	OAS2	2'-5'-oligoadenylate synthetase 2, 69/71kDa	26,9		29,2		32,1
218400_at	OAS3	2'-5'-oligoadenylate synthetase 3, 100kDa	14,2		10,9		14,9
232666_at	OAS3	2'-5'-oligoadenylate synthetase 3, 100kDa					6,3
205660_at	OASL	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like	6,9		6,1		8,1
210797_s_at	OASL	2'-5'-oligoadenylate synthetase-like	8,3		7,8		9,9
209791_at	PADI2	peptidyl arginine deiminase, type II			4,2	7,5	7,2
220779_at	PADI3	peptidyl arginine deiminase, type III		4,2	9,2	17,4	25,5
223220_s_at	PARP9	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 9	5,2		5,2		5,5
227807_at	PARP9	poly (ADP-ribose) polymerase family, member 9	4,1		4,7		6,2
228635_at	PCDH10	protocadherin 10					8,6
227289_at	PCDH17	protocadherin 17					7,7
205534_at	PCDH7	protocadherin 7				7,0	12,3
205535_s_at	PCDH7	protocadherin 7					6,2
218952_at	PCSK1N	proprotein convertase subtilisin/kexin type 1 inhibitor				5,8	6,3
205226_at	PDGFRL	platelet-derived growth factor receptor-like				4,5	6,1
210145_at	PLA2G4A	phospholipase A2, group IVA (cytosolic, calcium-dependent)		3,3	4,4	9,8	10,8
201860_s_at	PLAT	plasminogen activator, tissue		2,0	3,1	4,1	6,0
235061_at	PPM1K	protein phosphatase 1K (PP2C domain containing)	4,2	2,7	7,0	5,3	8,3
244011_at	PPM1K	protein phosphatase 1K (PP2C domain containing)	4,7	4,0	6,8	6,5	6,8
227006_at	PPP1R14A	protein phosphatase 1, regulatory (inhibitor) subunit 14A					6,3
228230_at	PRIC285	peroxisomal proliferator-activated receptor A interacting complex 285	4,6		5,3		5,1

207388_s_at	PTGES	prostaglandin E synthase			4,2	5,6	8,0
210367_s_at	PTGES	prostaglandin E synthase			2,9	3,5	5,9
209465_x_at	PTN	pleiotrophin (heparin binding growth factor 8, neurite growth-promoting factor 1)					6,7
211737_x_at	PTN	pleiotrophin (heparin binding growth factor 8, neurite growth-promoting factor 1)					7,1
206084_at	PTPRR	protein tyrosine phosphatase, receptor type, R				7,7	8,2
210675_s_at	PTPRR	protein tyrosine phosphatase, receptor type, R				12,8	13,8
244745_at	RERG	RAS-like, estrogen-regulated, growth inhibitor				5,1	4,9
204337_at	RGS4	regulator of G-protein signalling 4				6,7	10,9
204338_s_at	RGS4	regulator of G-protein signalling 4				7,3	11,2
204339_s_at	RGS4	regulator of G-protein signalling 4				5,5	9,1
205158_at	RNASE4	ribonuclease, RNase A family, 4				6,7	5,3
215321_at	RPIB9	Rap2-binding protein 9				6,7	6,0
241703_at	RPIB9	Rap2-binding protein 9				7,8	7,0
224763_at	RPL37	Ribosomal protein L37	-1,9		-2,1	-2,0	-5,8
213797_at	RSAD2	radical S-adenosyl methionine domain containing 2	16,2		13,2		12,5
242625_at	RSAD2	radical S-adenosyl methionine domain containing 2	8,0		8,4		7,4
223719_s_at	RTBDN	retbindin				21,1	35,0
219691_at	SAMD9	sterile alpha motif domain containing 9	5,1		4,9		6,5
204502_at	SAMHD1	SAM domain and HD domain 1	5,8		5,6	2,0	5,6
206805_at	SEMA3A	sema domain, immunoglobulin domain (Ig), short basic domain, secreted, (semaphorin) 3A			3,7	4,7	7,3

205352_at	SERPIN1	serpin peptidase inhibitor, clade I (neuroserpin), member 1				6,5	8,5
227791_at	SLC9A9	solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 9		3,0	4,1	5,6	7,7
242587_at	SLC9A9	solute carrier family 9 (sodium/hydrogen exchanger), member 9			4,5	6,0	7,2
202507_s_at	SNAP25	synaptosomal-associated protein, 25kDa				4,8	5,3
202508_s_at	SNAP25	synaptosomal-associated protein, 25kDa		3,0	4,2	7,5	9,3
222513_s_at	SORBS1	sorbin and SH3 domain containing 1				5,7	6,2
224818_at	SORT1	sortilin 1				5,7	5,0
223980_s_at	SP110	SP110 nuclear body protein	3,1		5,5		7,5
235572_at	SPC24	SPC24, NDC80 kinetochore complex component, homolog (S. cerevisiae)					5,1
235334_at	ST6GALNA C3	ST6 (alpha-N-acetylneuraminyl-2,3-beta-galactosyl-1,3)-N-acetylgalactosaminide alpha-2,6-sialyltransferase 3				4,7	5,0
230261_at	ST8SIA4	ST8 alpha-N-acetylneuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 4			4,8	7,5	8,5
242943_at	ST8SIA4	ST8 alpha-N-acetylneuraminide alpha-2,8-sialyltransferase 4			3,1	4,9	6,2
232760_at	TEX15	testis expressed 15				10,6	11,9
223557_s_at	TMEFF2	transmembrane protein with EGF-like and two follistatin-like domains 2					13,8
202687_s_at	TNFSF10	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	3,2		4,3		8,1
202688_at	TNFSF10	tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	3,3		4,1		7,3

214329_x_at	TNFSF10	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 10	2,6		3,6		6,1
239288_at	TNIK	TRAF2 and NCK interacting kinase			2,5	4,8	5,6
205742_at	TNNI3	troponin I type 3 (cardiac)					6,1
230104_s_at	TPPP	tubulin polymerization promoting protein				6,3	5,2
242162_at	WDR69	WD repeat domain 69		4,8	4,5	10,0	10,2
206133_at	XAF1	XIAP associated factor-1	11,0		6,1		4,2
228617_at	XAF1	XIAP associated factor-1	17,5		12,5		7,3
242234_at	XAF1	XIAP associated factor-1	10,8				

Tabelle 30: *Microarray*-Daten: Alphabetisch sortiert. 5-tägige Behandlung mit VPA und IFN-alpha. Annotierte Gentranskripte, von denen mindestens eines gegenüber den Kontrollen *fold change* > 5 aufweist. LCB > 1,2. IFN = IFN-alpha (200 U / ml), 0,25 = VPA (0,25 mM), 0,25+ = VPA (0,25 mM) + IFN-apha, 1 = VPA (1 mM), 1+ = VPA (1 mM) + IFN-alpha.

9 Danksagung

Herrn Prof. Dr. phil. nat. R. Blaheta danke ich für die Übernahme der Betreuung und die zur Verfügungstellung der notwendigen Gerätschaften und Materialien. In seinem Labor habe ich meine Begeisterung für Zellkulturen entdeckt. Sein stets offenes Ohr, die wissenschaftlichen Anregungen und sein in mich gesetztes Vertrauen haben mich auch in manch schweren Zeiten immer wieder hoch motiviert und meine Freude an der Arbeit nie versiegen lassen.

Herrn Prof. Dr. phil. nat. J. Bereiter-Hahn danke ich für die Übernahme der Betreuung von Seiten des Fachbereichs Biowissenschaften. Seinen enthusiastischen Vorlesungen verdanke ich mein Interesse an den Vorgängen innerhalb der Zelle und Zellen im Allgemeinen.

Mein Dank gebührt ferner Herrn Müggenburg von der Müggenburg-Stiftung, welcher die notwendigen finanziellen Mittel für meine Doktorandenstelle zur Verfügung gestellt und damit die Realisierung dieser Arbeit maßgeblich ermöglicht hat.

Allen Mitarbeitern des chirurgischen Forschungslabors, insbesondere Frau C. Blumenberg, Frau I. Müller und Frau E. Oppermann danke ich dafür, dass sie mir jederzeit mit Rat und Tat zur Seite standen. Durch ihre kompetente Unterstützung und ihr unermüdliches Engagement konnten so manche Tücken des Laboralltags gemeistert werden.

Den Ausschüssen der Nachlässe Held-Hecker und der Ebert-Stiftung danke ich für die Bewilligung der finanziellen Mittel für die Durchführung der tierexperimentellen Studien, sowie den Freunden und Förderern der Johann Wolfgang Goethe-Universität und den Boehringer Ingelheim Fonds für die Ermöglichung des 3-monatigen Forschungsaufenthalts an den *Harvard Institutes of Medicine* und die dortige Durchführung der *Microarrays*.

In diesem Zusammenhang möchte ich mich ferner ganz herzlich bei dem Team des *BIDMC Genomic Centers* und *DF/HCC Cancer Proteomic Cores* der *Harvard Institutes of Medicine* bedanken. Implizit bei Herrn Prof. Dr. T. A. Libermann, dem dortigen Direktor für die 3-monatige Betreuung, dem Bioinformatiker M. Bhasin für die erste Analyse des gewonnenen Datenmaterials und Frau M. Joseph für die Einführung und Unterstützung bei der Durchführung der *Microarrays*.

Den Schwestern und Pflegern des Zentrums für Frauenheilkunde und Geburtshilfe der Universitätsklinik Frankfurt am Main danke ich für die zur Verfügungstellung von Nabelschnüren, die für die Isolation von humanen umbilikalen Endothelzellen (HUVEC) essentiell waren.

Weiterhin danke ich dem Blutspendedienst des Deutschen Roten Kreuzes der Universitätsklinik Frankfurt am Main für das humane Serum, welches wiederum für die Kultivierung von HUVEC benötigt wurde.

Herrn PD Dr. phil. nat. P. Bär und Frau M. Plöser aus der Nephrologie, Klinik der Inneren Medizin III der Universitätsklinik Frankfurt am Main verdanke ich die Isolation normaler Nierenzellen (PTC-Zellen) aus dem Gewebe, die in meinen Versuchen als Kontrolle für die Effekte von VPA und IFN-alpha auf Normalgewebe dienten.

Herrn J.U. Vogel von der Frankfurter Stiftung für krebskranke Kinder danke ich für die zur Verfügungstellung des Programms Sigma Plot, mit dem ein Großteil der gewonnenen Ergebnisse graphisch dargestellt wurde.

Frau S. Barth von der blue-drugs GmbH danke ich wiederum für die geduldige Mithilfe bei der Überarbeitung der analysierten *Microarray*-Daten.

Nicht zuletzt möchte ich meiner Familie, insbesondere meinem Mann und meinem Freundeskreis von ganzem Herzen für ihre moralische Unterstützung und das unerschütterliche Interesse danken.

10 Lebenslauf

Persönliche Daten:

Name: Eva Jünger, geb. Weich
Geburtsdatum/-ort: 28.08.1976 in Frankfurt am Main

Promotion:

01/2006 – heute **Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main, Zentrum der Chirurgie, Klinik für Urologie und Kinderurologie**

- Thema: „Präklinische Studien zur Behandlung des Nierenzellkarzinoms durch den HDAC-Inhibitor VPA und IFN-alpha“
- Doktorvater: Prof. Dr. Blaheta und Prof. Dr. Bereiter-Hahn
- Tätigkeiten: funktionelle und molekularbiologische Analysen, Betreuung medizinischer Doktoranden und Praktikanten, Verfassen von Anträgen und Veröffentlichungen

Forschungsaufenthalte:

02/2008 – 05/2008 **Harvard Institutes of Medicine, Beth Israel Deaconess Medical Center (BIDMC), Boston, MA, USA**

- Zweck: Durchführung von *Microarray* Analysen

Kongresse:

15. – 16.05.2009 **Oncology Research Day**, Novartis, Basel, Deutschland.
Vortrag: *“Urologic Tumors. Research in Frankfurt/Main”*

09. – 11.10.2008 **13th World Congress on Advances in Oncology and 11th International Symposium on Molecular Medicine**, Kreta, Griechenland. Vortrag: *“Combination Therapy of HDAC-Inhibitor VPA and IFN-alpha 2a modifies Gene Expression of RCC cells”*

11. – 13.10.2007 **12th World Congress on Advances in Oncology and 10th International Symposium on Molecular Medicine**, Kreta, Griechenland. Vortrag: *“HDAC Inhibitor VPA + IFN alpha Inhibits Proliferation and Adhesion in Renal Carcinoma Cells”*

12. – 14.10.2006 **11th World Congress on Advances in Oncology and 9th International Symposium on Molecular Medicine**, Kreta, Griechenland. Vortrag: *“Human cytomegalovirus infection is associated with enhanced malignancy of prostate carcinoma cells”*

16.09.2005 **9. Chirurgische Forschungstage**, Frankfurt am Main. Poster: „Der Einfluss von humanen Cytomegalieviren (HCMV) auf die Malignität von Prostata-Tumorzellen“

Fortbildung:

03/2008 – 05/2008 **Advanced Writing and Grammar Skills**, Brookline Adult & Community Education, The Public Schools of Brookline, Boston, MA, USA

11/2007 **Workshop of Medical Writing**, Focus on Targeted Therapies, Pfizer, Frankfurt am Main

Nebentätigkeit:

02/2001 – 09/2006 CBP Projektmanagement GmbH in Frankfurt am Main: Werkstudentin

Studium:

10/2000 – 04/2005 **Studium der Biologie (Diplom) an der Johann Wolfgang Goethe-Universität Frankfurt am Main**

- Abschluss: Diplom-Biologin, Note: „sehr gut“ (1,1)
- Hauptfächer: Genetik, Zell- und Entwicklungsbiologie, Neurobiologie
- Diplomthema: „Der Einfluss einer humanen Zytomegalievirus-Infektion auf die Malignität von Prostata-Tumorzellen“

Sonstige Praktika/Seminare:

11/2003 – 02/2004 Zentrum der Rechtsmedizin der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main, Seminar „Forensische Biologie“

10/2003 Molekulare Kardiologie im Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt am Main, Praktikum

- 07/2003 – 08/2003 Zentrum der Hygiene, Institut für Medizinische Virologie im
Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität in Frankfurt
am Main, Praktikum
- 11/2002 – 12/2002 Infektionslaboratorium der Medizinischen Klinik III,
Schwerpunkt: Infektiologie, am Zentrum der Inneren Medizin
im Klinikum der Johann Wolfgang Goethe-Universität in
Frankfurt am Main, Praktikum

Berufsausbildung & -erfahrung:

- 06/2000 – 10/2000 Deutsche Lufthansa AG, Frankfurt/Main: Flugbegleiterin
- 04/2000 – 06/2000 Deutsche Lufthansa AG, Frankfurt/Main: Ausbildung zur Flug-
begleiterin
- 11/1999 – 03/2000 Hilton Frankfurt: Group & Fair Sales Executive
- 05/1998 – 11/1999 Hilton Zürich Airport: Rezeptionistin
- 02/1998 – 04/1998 Sheraton Frankfurt Hotel: Floor Supervisor
- 08/1995 – 02/1998 Sheraton Frankfurt Hotel: Ausbildung zur Hotelkauffrau

Schulabschluss:

- 1995 Abitur am Georg-Büchner-Gymnasium in Bad Vilbel

Sprachkenntnisse:

- Englisch verhandlungssicher
- Französisch Schulkenntnisse

EDV-Kenntnisse:

- MS Office sehr gut
- Internet sehr gut
- Sigma Plot gut

11. Publikationsliste

Blaheta RA, Powerski M, Hudak L, **Juengel E**, Jonas D, von Knethen A, Doerr HW, Cinatl J. Tumour-endothelium crosstalk blocks recruitment of neutrophils to endothelial cells. A novel mechanism of endothelial cell anergy. *Neoplasia*. 2009; im Druck.

Juengel E, Engler J, Mickuckyte A, Jones J, Hudak L, Jonas D, Blaheta RA. Effects of combined valproic acid and the EGF/VEGF receptor tyrosine kinase inhibitor AEE788 on renal cell carcinoma cell lines in vitro. *BJU International*. 2009; im Druck.

Juengel E, Engler J, Natsheh I, Jones J, Mickuckyte A, Hudak L, Jonas D, Blaheta RA. Combining the receptor tyrosine kinase inhibitor AEE788 and the mammalian target of rapamycin (mTOR) inhibitor RAD001 strongly inhibits adhesion and growth of renal cell carcinoma cells. *BMC Cancer*. 2009; 9: 161.

Jones J, **Juengel E**, Mickuckyte A, Hudak L, Wedel S, Jonas D, Hintereder G, Blaheta RA. Valproic acid blocks adhesion of renal cell carcinoma cells to endothelium and extracellular matrix. *J Cell Mol Med*. 2008; im Druck.

Jones J, Bentas W, Blaheta RA, Makarevic J, Hudak L, Wedel S, Probst M, Jonas D, **Juengel E**. Modulation of adhesion and growth of colon and pancreatic cancer cells by the histone deacetylase inhibitor valproic acid. *Int J Mol Med*. 2008; 22(3): 293-9.

Wedel SA, Mickuckyte A, **Juengel E**, Jones J, Hudak L, Jonas D, Blaheta RA. Preclinical studies on the influence of the tyrosine kinase inhibitor AEE788 on malignant properties of renal cell carcinoma cells. *Urologe A*. 2008; 47(9): 1175-81.

Jones J, **Juengel E**, Mickuckyte A, Hudak L, Wedel S, Jonas D, Blaheta RA. The Histone Deacetylase inhibitor valproic acid alters growth properties of renal cell carcinoma in vitro and in vivo. *J Cell Mol Med*. 2008; im Druck.

Leckel K, Strey C, Bechstein WO, Boost KA, Auth MK, El Makhfi A, **Juengel E**, Wedel S, Jones J, Jonas D, Blaheta RA. Autocrine stimulation of human hepatocytes triggers late DNA synthesis and stabilizes long-term differentiation in vitro. *Int J Mol Med*. 2008; 21(5): 611-20.

Wedel SA, Sparatore A, Del Soldato P, Al-Batran SE, Atmaca A, **Juengel E**, Hudak L, Jonas D, Blaheta RA. New Histone Deacetylase Inhibitors As Potential Therapeutic Tools For Advanced Prostate Carcinoma. *J Cell Mol Med*. 2008; 12(6A): 2457-66.

Jones J, Berkhoff S, **Weich E**, Engl T, Wedel S, Relja B, Jonas D, Blaheta RA: Transient down-regulation of beta1 integrin subtypes on kidney carcinoma cells is induced by mechanical contact with endothelial cell membranes. *J Cell Mol Med*. 2007; 11(4): 826-38.

Jones J, Marian D, **Weich E**, Engl T, Wedel S, Relja B, Jonas D, Blaheta RA: CXCR4 chemokine receptor engagement modifies integrin dependent adhesion of renal carcinoma cells. *Exp Cell Res*. 2007; 313(19): 4051-65.

Blaheta RA, Michaelis M, Natsheh I, Hasenberg C, **Weich E**, Relja B, Jonas D, Doerr HW, Cinatl J Jr: Valproic acid inhibits adhesion of vincristine- and cisplatin-resistant neuroblastoma tumour cells to endothelium. *Br J Cancer*. 2007; 96(11): 1699-706.

Blaheta RA, Daher FH, Michaelis M, Hasenberg C, **Weich EM**, Jonas D, Kotchetkov R, Doerr HW, Cinatl J Jr: Chemoresistance induces enhanced adhesion and transendothelial penetration of neuroblastoma cells by down-regulating NCAM surface expression. *BMC Cancer*. 2006; 6: 294.

Blaheta RA, **Weich E**, Marian D, Bereiter-Hahn J, Jones J, Jonas D, Michaelis M, Doerr HW, Cinatl J Jr: Human cytomegalovirus infection alters PC3 prostate carcinoma cell adhesion to endothelial cells and extracellular matrix. *Neoplasia*. 2006; 8(10): 807-16.

Oertl A, Relja B, Makarević J, **Weich E**, Höfler S, Jones J, Jonas D, Bratzke H, Baer PC, Blaheta RA: Altered expression of beta 1 integrins in renal carcinoma cell lines exposed to the differentiation inducer valproic acid. *Int J Mol Med*. 2006; 18(2): 347-54.