

Wirkung der Klasse I spezifischen Histondeacetylaseinhibitoren MS-275 und
MGCD0103 sowie des Breitspektrum-inhibitors LBH589 auf die Differenzierung von
humanen mesenchymalen Stammzellen

Inauguraldissertation
zur Erlangung des Grades eines Doktors der Medizin
des Fachbereichs Medizin
der Justus-Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von Christoph Schröder
aus Wildeshausen

Gießen 2017

Aus der klinischen Forschungseinheit
Leitung: Prof. Dr. med. Thomas Linn
Medizinische Klinik und Poliklinik III
Direktor: Prof. Dr. med. Andreas Schäffler
Universitätsklinikum Gießen und Marburg GmbH, Standort Gießen
Justus-Liebig-Universität

Gutachter: Prof. Dr. Thomas Linn

Gutachterin: Frau Prof. Dr. Katrin Susanne Lips

Tag der Disputation: 12.12.2017

Inhalt

1	Einleitung	1
1.1	Diabetes mellitus	1
1.1.1	Definition	1
1.1.2	Epidemiologie	2
1.1.3	Therapie des Diabetes mellitus	2
1.1.4	Neuere Therapieansätze	3
1.2	Organisation der DNA bei Eukaryoten	3
1.3	Histonmodifikationen.....	4
1.4	Histondeacetylasen.....	5
1.4.1	Wirkung auf andere Proteine.....	6
1.4.2	Mechanismus der Deacetylierung	6
1.5	Histondeacetylase Inhibitoren (HDACi).....	7
1.5.1	Klassifikation HDACi	8
1.5.2	HDACi in klinischer Anwendung	10
1.5.3	LBH589 (Panobinostat).....	11
1.5.4	MS-275 (Entinostat).....	13
1.5.5	MGCD0103 (Mocetinostat)	14
1.6	Humane Stammzellen	14
1.6.1	Mesenchymale Stammzellen.....	15
1.7	Telomerase und Zellalterung.....	17
1.8	Embryonalentwicklung des Pankreas.....	18
1.9	Differenzierungsfaktoren bei der Pankreasentwicklung	20
1.9.1	NeuroD.....	20
1.9.2	Pax6.....	21
1.9.3	ISL-1.....	21
1.9.4	NKX6.1 und NKX2.2.....	23
1.10	Differenzierungsprotokolle zur Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu insulinproduzierenden Zellen	24
1.10.1	HDACi in Differenzierungsprotokollen.....	25
1.11	Ziele der Arbeit.....	26
2	Materialien	28
2.1	Zelllinie	28
2.2	Chemikalien	28
2.3	Puffer und Lösungen	30
2.4	Kits	31
2.5	Laborequipment / Verbrauchsmaterialien	31

2.6	Verwendete Geräte	32
2.7	Software	33
3	Methoden.....	33
3.1	Zellzählung.....	33
3.2	Konfluenzmessung	34
3.3	Durchflusszytometrische Zellcharakterisierung.....	34
3.4	Kultivierung der humanen mesenchymalen Stammzellen	36
3.5	20 tägige Zellkultur mit HDACi-Behandlung zur Probengewinnung von HDAC-Enzymen für den HDAC-Aktivitätsassay.....	37
3.6	Herstellung der Zelllysate / Proteinisolation	38
3.7	Puffersysteme	39
3.8	Bestimmung der Proteinmenge in den Zelllysaten	39
3.9	HDAC-Aktivitätsversuch	40
3.10	Vorversuchsreihen zum HDAC-Aktivitätsassay	42
3.10.1	Wahl eines geeigneten Lysepuffer und Festlegung einer optimalen Lysatmenge.....	42
3.10.2	Festlegung einer geeigneten Boc-Lys(Ac)-AMC Substratmenge	44
3.11	Untersuchung der Genexpression.....	47
3.11.1	RNA-Isolation und photometrische Konzentrationsbestimmung	47
3.11.2	cDNA-Synthese.....	47
3.11.3	Real-time PCR.....	48
3.11.4	Testen der Stabilität der Haushaltsgene.....	49
3.11.5	Polymerase-Kettenreaktion und Agarose-Gelelektrophorese	50
3.11.6	Herstellung eines Agarosegels und Gelelektrophorese	51
3.11.7	Statistische Auswertung	52
4	Ergebnisse	53
4.1	Durchflusszytometrische Zellcharakterisierung.....	53
4.2	HDAC-Aktivitätsversuch	55
4.2.1	Auswahl eines geeigneten Lysepuffers	56
4.2.2	Festlegung einer geeigneten Proteinmenge.....	58
4.2.3	Festlegung einer geeigneten Boc-Lys(Ac)-AMC Substratmenge.....	58
4.3	Hauptversuchsreihen	59
4.3.1	LBH589.....	60
4.3.2	MS-275.....	63
4.3.3	MGCD0103	65
4.4	Genexpression differenzierungsrelevanter Transkriptionsfaktoren unter dem Einfluss der HDACi	66
4.4.1	Polymerase-Kettenreaktion und Agarose-Gelelektrophorese zur qualitativen	

Primerkontrolle.....	68
4.4.2 Quantitative real-time PCR zur Messung der Veränderung der Genexpression unter dem Einfluss der HDACi	70
5 Diskussion	75
5.1 Real-time PCR Untersuchung der Genexpression endokriner Transkriptionsfaktoren unter der Behandlung mit HDACi	76
5.2 HDAC Aktivitäts-Assay	81
5.3 PCR und Agarosegelelektrophorese	82
6 Zusammenfassung	83
7 Summary	84
8 Abkürzungsverzeichnis	85
9 Abbildungsverzeichnis	87
10 Tabellenverzeichnis	88
11 Literaturverzeichnis.....	89
12 Publikationen.....	107
13 Erklärung zur Dissertation	108
14 Danksagung.....	109
15 Lebenslauf	110

1 Einleitung

1.1 Diabetes mellitus

1.1.1 Definition

Der Diabetes mellitus ist eine Sammelbezeichnung für Stoffwechselerkrankungen, die sich durch hyperglykämie Blutzuckerwerte (> 126 mg/dl, nüchtern) als Folge fehlerhafter Insulinsekretion oder -wirkung manifestieren. Neben akuten, teils lebensbedrohlichen Blutzuckerentgleisungen stellen gerade die Langzeitfolgen eines unbehandelten Diabetes eine große Belastung für den Patienten dar. Chronische Folgekrankheiten der Niere mit Nierenfunktionsverlust, des Auges mit Visusverlust, des Nervensystems mit Polyneuropathie sowie des Herz-Kreislaufsystems belasten zusätzlich das Gesundheitssystem (Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft et al. 2013).

Pathoätiologisch lässt sich die Erkrankung in vier Typen unterteilen: Der Typ 1 Diabetes mellitus ist durch den Untergang der insulinproduzierenden Betazellen charakterisiert. Er lässt sich weiter in zwei Subtypen gliedern. Der Typ 1a beschreibt eine immunologisch vermittelte Form die sich durch verschiedene Autoantikörper gegen Strukturen der Langerhans-Inseln charakterisieren lässt. Beim Typ 1b hingegen findet sich keine Antikörperbildung. Er beschreibt eine idiopathische Form des Betazelluntergangs, der mit hoher Penetranz vererbt wird. Der Typ 1 Diabetes wird mittels exogenen Insulinapplikationen unterschiedlicher Schemata behandelt (Böhm et al. 2011).

Dem Diabetes mellitus Typ 2 liegt eine periphere Insulinresistenz zusammen mit einem relativen Insulinmangel zugrunde. Eine multifaktorielle Genese dieser Erkrankung wird diskutiert, verschiedene Risikofaktoren führen zum Ausbruch der Erkrankung bei genetisch vererbter Prädisposition (Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft et al. 2013).

Als Diabetes mellitus Typ 4 wird der Gestationsdiabetes bezeichnet, eine Glucosestoffwechselerkrankung, die während der Schwangerschaft auftritt und sich prinzipiell nach deren Ende wieder zurückbilden kann.

Alle anderen Formen der Erkrankung fallen in die Sammelkategorien des Typ 3 Diabetes. Hierzu gehören Glucosestoffwechselerkrankungen ausgelöst durch genetisch defekte Betazellen, genetische Defekte in der Insulinwirkung, im Rahmen von Erkrankungen der Bauchspeicheldrüse oder Endokrinopathien wie beispielsweise beim Morbus Cushing,

medikamenteninduziert oder infektiös bedingt oder durch seltene immunologisch vermittelte Vorgänge und seltene Syndrome ausgelöste Formen (American Diabetes Association 2003).

1.1.2 Epidemiologie

Gemäß des Diabetes Atlas 2015 der internationalen Diabetesfederation, der durch groß angelegte Metaanalysen internationaler Daten berechnet wurde, sind weltweit 415 Millionen Menschen im Alter von 20 – 79 Jahren an Diabetes mellitus erkrankt. 12 % der globalen Ausgaben im Gesundheitssystem entfallen auf die Behandlung des Diabetes und seiner Folgeerkrankungen (International Diabetes Federation 2015; American Diabetes Association 2003). In Deutschland beträgt die Prävalenz des diagnostizierten Diabetes mellitus gemäß einem Gesundheitssurvey des Robert-Koch- Instituts in der Altersgruppe von 18-79 Jahren insgesamt 7,2% (4,6 Mio. Menschen). Hiervon stellt der Typ 1 Diabetes einen Anteil von 1,1 %. Generell ist die Lebenszeitprävalenz abhängig vom Alter und sozialen Status. Bei gesetzlich versicherten Patienten zeigte sich eine höhere Prävalenz im Vergleich zu Privatversicherten. Im Vergleich zum Bundes-Gesundheitssurvey von 1998 des Robert Koch Instituts ist die Prävalenz des diagnostizierten Diabetes mellitus um 38% gestiegen (Heidemann et al. 2013).

1.1.3 Therapie des Diabetes mellitus

Prinzipiell stehen zur medikamentösen Therapie des Diabetes mellitus zwei verschiedene Verfahren zur Verfügung. Zum einen kann eine Normalisierung der Blutzuckerwerte durch die Einnahme oraler Antidiabetika (OAD) erreicht werden. Hier steht eine Vielzahl verschiedener Substanzen zur Verfügung. Eine erfolgreiche Behandlung mittels dieser Arzneistoffe setzt jedoch eine erhaltene endogene Insulinproduktion voraus, wie sie beim Typ 2 Diabetes vorliegt (Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft et al. 2013). Zur Behandlung des absoluten Insulinmangels benötigt man exogen zugeführtes Insulin bzw. dessen Analoga. Es existieren unterschiedliche Applikationsschemata aus Langzeit- und Kurzzeitinsulinen für eine möglichst physiologische Blutzuckerkontrolle. Dennoch

birgt eine strikte Blutzuckereinstellung mit Insulin stets die Gefahr lebensbedrohlicher hypoglykämischer Phasen (Böhm et al. 2011).

1.1.4 Neuere Therapieansätze

Die Transplantation von allogenen Inselzellen führte bei Patienten zu einer bis zu fünf Jahren bestehenden Möglichkeit von exogener Insulinfreiheit. Jedoch ist dieser Ansatz durch die Verfügbarkeit von Inselzellspendern stark limitiert (Bellin et al. 2012).

Bei der allogenen Inselzelltransplantation werden Inseln von hirntoten Spendern explantiert und ABO-kompatibel über die Portalvene in die Leber implantiert. Neben der Notwendigkeit einer langzeitigen Immunsuppression nach der Transplantation ist ein weiterer Nachteil die hohe Anzahl der benötigten Zellen. Um eine Glucosehomöostase zu ermöglichen werden ca. 10.000 Inseln pro Kilogramm Körpergewicht benötigt. Das Angebot an Spenderzellen ist jedoch begrenzt. Auch ein dauerhafter Erhalt der transplantierten Zellen ist z. Zt. noch nicht möglich. Diese Problematik stellt weiterhin ein großes Hindernis beim Versuch des physiologischen Betazellersatz dar (Shapiro et al. 2006).

In präklinischen Studien wird versucht, insulinproduzierende Zellen aus körpereigenen Stammzellen zu gewinnen, um diese dann autolog zu transplantieren. So könnte das Problem der Knappheit an Spenderzellen und der Immunsuppression umgangen werden (Rekittke et al. 2016).

1.2 Organisation der DNA bei Eukaryoten

Die Desoxyribonucleinsäure (DNA) ist ein Makromolekül, welches die genetische Information eines Lebewesens trägt (Berg et al. 2014).

Sie besteht aus zwei helical angeordneten Ketten. Die einzelnen Monomere dieser Ketten bestehen aus den Basen Adenin, Cytosin, Guanin und Thymin. Diese sind gekoppelt an Desoxyribosen, die über Phosphatreste miteinander verbunden sind (WATSON und CRICK 1953). Bei Eukaryoten ist die DNA, als Chromatin verpackt, im Zellkern lokalisiert. Das Chromatin setzt sich aus einzelnen Untereinheiten, den Nukleosomen, zusammen. Jedes Nukleosom besteht aus einem ca. 147 Basenpaar (bp) langem DNA-Abschnitt, der sich um einen Histonkomplex wickelt. Dieser Komplex besteht aus jeweils

zwei Histonmolekülen H2A, H2B, H3 und H4. Zwischen den einzelnen Nucleosomen findet sich ein kurzer Abschnitt von linker DNA. An diesen legt sich das Histon H1 bei Ein- bzw. Austritt der DNA an das Nucleosom und stabilisiert somit die Nucleosomenstruktur (Hergeth und Schneider 2015).

Durch die Windung der DNA um die Histone kann ein ca. 68 nm messender DNA-Abschnitt auf ungefähr 10 nm komprimiert werden. Dadurch wird erreicht, dass die gesamte Erbgutmenge Platz im Zellkern findet (Berg et al. 2014).

1.3 Histonmodifikationen

Histone dienen jedoch nicht nur der Verpackung der DNA, sondern stellen einen wichtigen Bestandteil eines Systems dar, welches die Expression und Transkription von Genen steuert. Sie können posttranslational an ihren N-terminalen Schwänzen kovalent verändert werden. Die häufigsten Modifikationen hierbei stellen Acetylierung, Methylierung, Phosphorylierung sowie Ubiquitylierung dieser Verpackungsproteine dar. Die Veränderungen haben vielfältigen Einfluss auf die Chromatinstruktur sowie auf Nicht-Histonproteine, die mit der DNA in Wechselwirkung treten, z.B. Transkriptionsfaktoren (Zhang et al. 2015).

Die Modifikation durch Acetylierung stellt einen bisher gut untersuchten Mechanismus dar. Generell geht ein erhöhter Anteil acetylierter Histone mit verstärkter Transkription einher. Hypoacetylierte Chromatinstrukturen hingegen zeigen eine verminderte Genexpression (de Ruijter, Annemieke J. M. et al. 2003; Allfrey et al. 1964).

Histone können sowohl an der äußeren Oberfläche der Oktamerstruktur als auch an ihren, aus dem Nucleosom herausragenden Schwänzen, acetyliert werden. Die Acetylierung von Lysinresten an der Oktameroberfläche hat einen direkten Einfluss auf die Histon-DNA-Interaktion. Wechselwirkungen zwischen den positiv geladenen Lysinresten und dem negativ geladenem Phosphatrückgrat der DNA werden durch die Acetylierung neutralisiert. Das führt zu einer gelockerten Chromatinstruktur und somit zur Freilegung von Genen. So wurde gezeigt, dass die Acetylierung des Lysin 64 an Histon H3 (H3K64ac) gehäuft in Regionen hoher transkriptorischer Aktivität vorkam und dass diese Acetylierung zu einer gelockerten Chromatinstruktur führte, die den Vorgang der Transkription erleichterte (Di Cerbo et al. 2014). Darüber hinaus kommt der Modifikation

der Histonschwänze aufgrund ihrer guten Zugänglichkeit eine weitere wichtige Rolle zu (Di Cerbo et al. 2014). Acetylierte Lysin-Reste können von den Bromodomänen wichtiger Effektorproteine erkannt werden und somit sehr spezifische Effekte auf die Chromatinstruktur und Genexpression ausüben (Zeng und Zhou 2002).

1.4 Histondeacetylasen

Das Acetylierungsmuster der Histone innerhalb des Chromatins entsteht durch ein dynamisches Zusammenspiel von Histon Acetyltransferasen (HATs) und Histon Desacetylasen (HDACs) (de Ruijter, Annemieke J M et al. 2003). Während die HATs obig beschriebene Vorgänge bewirken, nehmen die HDACs die Rolle ihrer Gegenspieler ein. HDACs lassen sich anhand ihrer Phylogenese in vier verschiedene Klassen einteilen (Gregoretto et al. 2004). Die HDACs der Gruppen I, II und IV enthalten in ihrem aktiven Zentrum ein Zink-Ion. Die HDACs der Klasse III arbeiten NAD⁺-abhängig und sind nicht Gegenstand dieser Arbeit. Die Klasse I der HDACs beinhaltet die HDACs 1, 2, 3 und 8. Der Klasse II lassen sich die HDACs 4, 5, 6, 7, 9 und 10 zuordnen. Diese lassen sich noch weiter unterteilen: IIa (HDAC 4, 5, 7 und 9) und IIb (HDAC 6 und 10) (Verdin et al. 2003; de Ruijter, Annemieke J M et al. 2003). Die HDAC 11 stellt den z.Zt. einzigen Vertreter der Klasse IV dar. Sie ist überwiegend im Zellkern lokalisiert und gewebsspezifisch exprimiert (Gao et al. 2002).

Die einzelnen Klassen unterscheiden sich durch ihre Lokalisation innerhalb der Zelle. Während die HDACs der Klasse I nahezu ausschließlich im Zellkern lokalisiert sind und hier ihre Funktion ausüben, ist es den Mitgliedern der Klasse II möglich, zwischen Zellkern und Zytoplasma zu pendeln. Sie wirken überwiegend auf Nicht-Histonproteine wie z.B. auf das Hitzeschockprotein Hsp90, welches durch HDAC 6 deacetyliert und somit funktionell beeinflusst wird (de Ruijter, Annemieke J M et al. 2003; Bali et al. 2005).

Weitere Unterschiede treten bezüglich des Vorkommens in verschiedenen Gewebearten auf. Während HDACs der Klasse I ubiquitär exprimiert werden, zeigen HDACs der Klasse II eine stärkere Gewebsspezifität und übernehmen in dem jeweiligen Gewebe spezifische Aufgaben (Dokmanovic et al. 2007; Hildmann et al. 2006).

1.4.1 Wirkung auf andere Proteine

Neben den Histonen deacetylieren die HDACs noch andere Proteine. Bisher sind über 50 weitere Substrate bekannt. Klasse I HDACs nehmen dadurch u.a. Einfluss auf Zellproliferation und -überleben (Dokmanovic et al. 2007). HDAC 1 und HDAC 3 stabilisierten zum Beispiel den Hypoxie-induzierten Faktor durch direkte Interaktion mit dem Transkriptionsfaktor. Damit schafften sie eine verbesserte Anpassung der Zelle an Hypoxie (Kim et al. 2007). HDAC 2 reguliert das Tumorsuppressorprotein p53. DNA-Schäden führen zu einer verstärkten Acetylierung dieses Transkriptionsfaktors und verhindern dadurch dessen Abbau. P53 kann jetzt den Eintritt der Zelle in den Zellzyklus stoppen. Die HDAC 2 inhibiert jedoch die DNA-Bindung des Tumorsuppressors und führt dadurch zu einer verminderten Wirkung dieses Schutzsystems (Feng et al. 2005; Li et al. 2002; Kim et al. 2007).

Ein besonderer Fokus bezüglich Zelldifferenzierung lag in den letzten Jahren auf der Betrachtung von micro RNAs (miRNAs). Dies sind nicht kodierende, kurze RNA Sequenzen, welche post Transkription die Genexpression verschiedener Gene regulieren können. Für eine Reihe von HDACi wurde gezeigt, dass sie auf diese miRNA wirken (Henrici et al. 2015; Di Fazio et al. 2013; Bartel 2004; Bravo-Egana et al. 2008; Chen et al. 2006).

1.4.2 Mechanismus der Deacetylierung

Das katalytische Herzstück der HDACs besteht aus einer ca. 390 Aminosäuren messenden Sequenz, die über alle HDACs der Gruppen I, II und IV konservierte Anteile enthält. Hier befindet sich das aktive Zentrum. Dieses besteht aus einer ca. 1,1 nm tiefen, tubulären Tasche. An deren Boden befindet sich ein zweifach positiv geladenes Zinkion. Außerdem enthält die Tasche ein für die katalytische Aktivität wichtiges Ladungsübertragungssystem, bestehend aus zwei Aspartat-, zwei Histidin- sowie einem Tyrosinrest. Manche HDACs der Klasse II besitzen Asparaginreste anstelle von Aspartat. Durch ein komplexes Zusammenspiel aus Wasserstoffbrückenbildung und Elektronenflüssen innerhalb des aktiven Zentrums wird die Entfernung von Acetylgruppen katalysiert (Finnin et al. 1999).

1.5 Histondeacetylase Inhibitoren (HDACi)

Substanzen, die die Wirkung von HDACs hemmen, bezeichnet man als HDAC-Inhibitoren (HDACi). Ursprünglich lassen sie sich in Klasse-I-spezifische Inhibitoren mit überwiegender Wirkung auf die HDACs 1, 2, 3, 8 sowie in Breitspektrum-inhibitoren gliedern. Letzteren lassen sich die Hydroxamsäuren Panobinostat (LBH589), Vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) und Belinostat (PXD101) zuordnen. Vertreter der Klasse-I-spezifischen HDACi sind u.a. die Benzamide Entinostat (MS-275) und Mocetinostat (MGCD0103) (Qian et al. 2006; Atadja 2009).

Mittlerweile gibt es eine Vielzahl neu synthetisierter HDACi, die orientiert an den ursprünglichen Substanzen hergestellt werden (Manal et al. 2016).

Die Grundstruktur der HDACi besteht typischerweise aus drei Komponenten: Das eine Ende ist durch eine aromatische Kappe gekennzeichnet. Der Mittelteil besteht aus einer aliphatischen Kette, die das Kappenende mit der Zink-bindenden Gruppe verbindet. Die Zink-bindende Einheit besteht zum Beispiel aus einer Hydroxamsäure oder aus einem Benzamid. Die HDAC-Inhibition kommt dadurch zustande, dass sich die lange aliphatische Kette des Inhibitors in die Tasche des aktiven Zentrums der HDACs legt und multiple hydrophobische Wechselwirkungen ausbildet. Die aromatische Kappe verschließt die Tasche und die Zink-bindende Einheit koordiniert das Ion am Boden der Tasche. Somit wird das aktive Zentrum der Enzyme blockiert und eine Deacetylierung von Proteinen, speziell Histonen, verhindert (Li und Woster 2015; Finnin et al. 1999). Durch die Enzyminhibition kommt es zu einer Zunahme acetylierter Histone und somit zu einer gesteigerten Aktivierung bestimmter Gene durch Relaxation der Chromatinstruktur (de Ruijter, Annemieke J M et al. 2003).

Eine der ersten Substanzen, der eine Histondeacetylase inhibitorische Wirkung nachgewiesen wurde, war Natriumbutyrat. Eine 21 stündige Behandlung von HeLa Zellen führte nachweislich zu einer gesteigerten Acetylierung der Histone H3 und H4 (Boffa et al. 1978). Generell haben HDACi das Potential Einfluss auf die Genexpression, den Zellzyklus, sowie die Differenzierung einer Zelle zu nehmen. Wie genau das im Einzelnen geschieht ist komplex und noch nicht vollständig geklärt (Lee et al. 2006; Finnin et al. 1999; Dokmanovic et al. 2007; Peart et al. 2005; Haumaitre et al. 2008). Auch welche Gene sie im Einzelnen regulieren, ist noch nicht vollends geklärt. Durch HDACi beeinflusste Gene stellen je nach Studie zwischen 2-10% des gesamten Genoms.

Während einige Gene heraufreguliert werden, kommt es bei anderen Genen zu einer Herunterregulierung der Transkription durch HDACi (Peart et al. 2005; van Lint et al. 1996; Lee et al. 2006; Dokmanovic et al. 2007; Glaser et al. 2003). Bei Genen, die früh (nach 1-4 h) auf die Wirkung von HDACi ansprechen, im englischen als „early genes“ bezeichnet, wird überwiegend eine Heraufregulation beobachtet. Eine Repression der Genexpression bestimmter Gene nimmt erst nach längerer HDACi-Wirkung über die Zeit zu (Peart et al. 2005).

1.5.1 Klassifikation HDACi

Mittlerweile sind eine Reihe verschiedener HDACi bekannt (Tabelle 1), die sich bezüglich ihrer chemischen Struktur in sechs Klassen einteilen lassen: Hydroxamsäuren, Benzamide, kurzkettige Fettsäuren, zyklische Tetrapeptide, elektrophile Ketone und eine Sammelkategorie „Sonstige“. Die einzelnen Klassen zeigen eine unterschiedliche Wirkstärke und Spezifität. Während z.B. die Hydroxamsäuren Trichostatin A (TSA) eine inhibitorische Wirkung im nanomolaren Bereich zeigt, so liegt die IC₅₀ des Benzamids MS-275 im micromolaren Bereich (Bolden et al. 2006; Yoshida et al. 1990; Saito et al. 1999).

Klasse	Verbindung		Optimaler Wirkbereich	HDAC Spezifität
Hydroxamsäure	Trichostatin	A	nM	Klasse I und II
	(TSA)			
	Vorinostat		μM	Klasse I und II
	PXD101		μM	Klasse I und II
	LBH589 (Panobinostat)		nM	Klasse I und II
	Pyroxamide		μM	Klasse I, unbekannter Effekt auf Klasse II
Benzamide	MS-275 (Entinostat)		μM	Klasse I
	MGCD-0103 (Mocetinostat)		μM	Klasse I
Kurz-kettige Fettsäuren	Butyrate		mM	Klasse I und IIa
	Valproic acid (VPA)		mM	Klasse I und IIa
Zyklische Tetrapeptide	Depsipeptide		nM	Klasse I
Elektrophile Ketone	Trifluoromethylketone		μM	Nicht bekannt
„Sonstige“	Depudecin		μM	Klasse I, unbekannter Effekt auf Klasse II

Tabelle 1: Auswahl einiger Vertreter der HDACi. Dargestellt mit dem jeweiligen Wirkbereich. Modifiziert nach Bolden et al. 2006.

1.5.2 HDACi in klinischer Anwendung

Der bisherige klinische Hauptanwendungsbereich der HDACi (Tabelle 2) findet sich in der Onkologie (West und Johnstone 2014; Rasheed et al. 2007). Durch ihre modulierende Wirkung auf Zellzyklus und Genexpression stellen HDACi hier einen Ansatz zur Therapie dar. Alleine oder in Kombination mit anderen Antitumorsubstanzen regulieren sie in Krebszellen die Transkription von proapoptotischen Proteinen herauf, die von anti-apoptotischen herunter. Sie führen zu einem Proliferationsstopp, zur Differenzierung und zur Apoptose von Tumorzellen (Mitsiades et al. 2004; Nebbioso et al. 2005; Richon et al. 2000; Salmon et al. 2015; Bots et al. 2014). Die erste Marktzulassung für einen HDACi erteilte die US Food and Drug Administration (FDA) im Oktober 2006 dem Breitspektrum-inhibitor Vorinostat für die Therapie des kutanen T-Zell Lymphoms (Center for Drug Evaluation and Research), nachdem in klinischen Studien eine 24%ige Ansprechrate sowie Symptomverbesserung nachgewiesen wurde (Duvic et al. 2007).

Im Jahr 2009 und 2014 wurden zwei weitere HDACi zugelassen, Romidepsin und Belinostat, zur Therapie des kutanen T-Zell Lymphoms bzw. des rezidivierenden oder refraktären peripherem T-Zell-Lymphoms. Am 23. Februar 2015 folgte Panobinostat (LBH589), welches eine Zulassung in Kombination mit dem Proteasominhibitor Bortezomib und Dexamethason zur Behandlung des Multiplen Myeloms erhielt (Center for Drug Evaluation and Research).

Zurzeit befinden sich eine Reihe anderer HDACi in klinischen Studien und lassen v.a. in Kombination mit anderen Substanzen auf eine Verbesserung der Tumorthherapie hoffen (Nebbioso et al. 2012).

HDACi	Sponsor	Status
Vorinostat	Zolinza, Merck & Co., Inc.	Zulassung beim kutanen T-Zell-Lymphom (Center for Drug Evaluation and Research)
Panobinostat	Novartis	Zulassung für das Multiple Myelom
Entinostat	Syndax	Phase III Studie beim Hormonrezeptor positivem Brustkrebs
Mocetinostat	Mirati Therapeutics	Phase II Studie beim Blasenkarzinom, Phase II Studie beim diffusen großzelligem B-Zell Lymphom oder Follikularzelllymphom
Ricolinostat	Acetylon Pharmaceuticals	Phase II beim Multiplem Myelom und Lymphom

Tabelle 2: HDACi in klinischer Anwendung. Modifiziert nach Guha 2015.

Auch abseits der Tumorthherapie zeigten HDACi vielversprechende Wirkungen: In verschiedenen Untersuchungen wurde eine immunsuppressive Wirkung dieser Hemmstoffe beobachtet. So konnte gezeigt werden, dass TSA die Expression von CD154, Interleukin-10 und Lupus T-Zellen herunterreguliert und somit mögliche neue Therapieansätze im Feld der Autoimmunerkrankungen aufzeigen kann (Leoni et al. 2002; I. M. und Kammer 2001).

1.5.3 LBH589 (Panobinostat)

Panobinostat (LBH589) ist eine Hydroxysäure mit hemmender Aktivität gegen HDACs der Klasse I, II und IV. Sie lässt sich somit den Breitspektrum-Inhibitoren zuordnen (Atadja 2009; Garnock-Jones 2015; Shao et al. 2010).

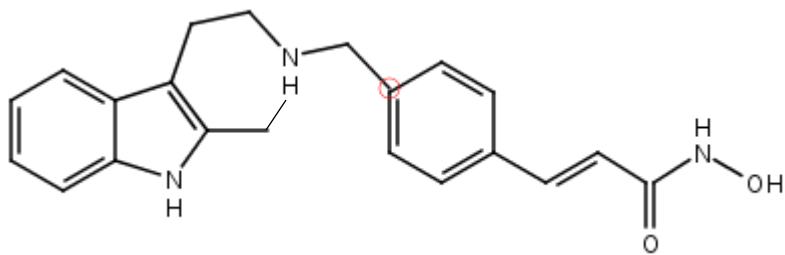


Abbildung 1: Strukturformel von LBH589. Erstellt nach (Atadja 2009).

Panobinostat führt in Konzentrationen von 5-20 nM zum Zellzyklusarrest, zur Apoptose und zur Hyperacetylierung der Histone H3 und H4. Weiter nimmt es, wahrscheinlich durch die Histonacetylierung, Einfluss auf die Genregulation. Es führte beispielsweise zur Heraufregulation der Genexpression von proapoptotischen Genen in humanen, leukämischen Zellreihen (Scuto et al. 2008).

Wie unterschiedlich Panobinostat auf verschiedene Zellen wirkt demonstrierten Shao et al anhand vier Zellreihen des kutanen T-Zell Lymphoms. Eine Behandlung im niedrigen nanomolaren Bereich führte bei HH und HuT78 Zellen, zwei der vier Zellreihen, zum frühzeitigen Erreichen des Zelltodes von mehr als 50% der Zellen. MJ und HuT102 Zellen hingegen zeigten kaum Zelluntergänge, selbst bei hohen Panobinostatkonzentrationen von bis zu 10 µM. Eine Akkumulation von acetylierten Histonen H3 und H4 konnte konzentrationsabhängig schon nach drei Stunden Behandlung in allen vier Zellreihen gemessen werden (Shao et al. 2010). Die optimale Wirkkonzentration von Panobinostat musste somit für jede Zellreihe individuell festgelegt werden. Nach Marktzulassung durch die FDA erhielt es 2012 in der Europäischen Union zunächst den „Orphan drug“ Status zur Behandlung des Multiplen Myeloms. (European Medicines Agency Accessed 2015) um anschließend im Spetember 2015 als Farydak[®] die Zulassung in der europäischen Union für die Behandlung des rezidivierenden Myeloms sowie zur Behandlung des refraktären Myeloms zu erhalten (Novartis 2015).

Neben diesen zugelassenen Therapieindikationen zeigte Panobinostat im Rahmen klinischer und präklinischer Studien zusätzlich vielversprechende Wirkung auf eine Reihe anderer solider und nicht solider Tumorzellen, wie z.B. auf das kutane T-Zell Lymphom, das diffus großzellige B-Zell Lymphom, auf die chronisch myeloische Leukämie, sowie beim kleinzelligen Lungenkarzinom oder bei Prostata-, Kolon- und Pankreaskarzinomzellen und bei der Tumorangiogenese (Marinis et al. 2013; Atadja

2009; Shao et al. 2010; Qian et al. 2006; Assouline et al. 2016; Grassadonia et al. 2013; Xiao et al. 2013; Lee et al. 2011; Wang et al. 2015; Matsuda et al. 2016). Schon früh wurde gezeigt, dass HDACi durch ihre Fähigkeit der epigenetischen Modulation dazu in der Lage sind, Differenzierungswege von Zellen, v.a. Stammzellen, zu steuern (Haumaitre et al. 2008). Auch der relativ neue HDACi Panobinostat zeigte eine sehr potente differenzierende Wirkung auf Zellen, einhergehend mit einem Proliferationsstopp (Waldeck et al. 2016). Der Einsatz dieser Substanz in Differenzierungsprotokollen für die Differenzierung von Stammzellen ist zurzeit jedoch noch spärlich und benötigt weitere Untersuchungen.

1.5.4 MS-275 (Entinostat)

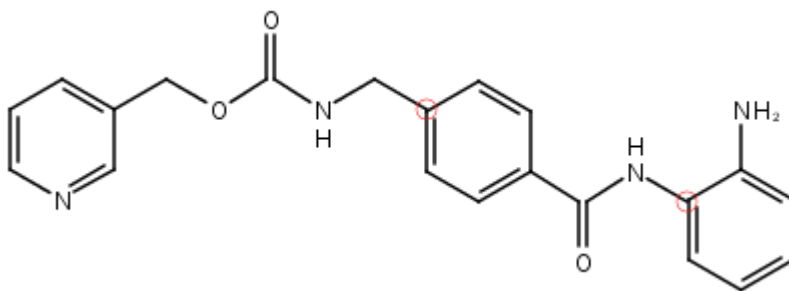


Abbildung 2: Strukturformel von MS-275. Erstellt nach (Atadja 2009).

Entinostat (MS-275) ist ein Derivat des Benzamids mit einer mittleren HDAC-inhibitorischen Konzentration (IC₅₀) von 0,0415 µM (Ovarialkarzinomzelllinie) bis 4,71 µM (Kolorektale Karzinomzelllinie). Es führte zum Proliferationsstopp und zur Hyperacetylierung der Histone H4 in einer Reihe verschiedener Tumorzelllinien (Suzuki et al. 1999; Hess-Stumpp et al. 2007).

MS-275 wirkt spezifisch auf die sich im Zellkern befindlichen HDAC 1 und HDAC 3 der Klasse I, nicht auf die HDAC 8 und es hat keinen Effekt auf die HDACs der Klasse II. Bei embryonalen Mausstammzellen führt die Behandlung mit MS-275 zu hyperacetylierten Histonen H3K9, H3K18 und H3K23 und modulierte das Differenzierungspotential dieser embryonalen Stammzellen (ESC) in Richtung neurale Progenitorzellen. Dieser Effekt war nach Entzug der Substanz vollständig reversibel. Insgesamt führte eine Behandlung der ESC mit 5 µM MS-275 zum Verlust der

Pluripotenz der Stammzelle und lenkte diese in Richtung Differenzierung (Hu et al. 2003; Franci et al. 2013).

1.5.5 MGCD0103 (Mocetinostat)

Mocetinostat (MGCD0103) ist ein Aminophenylbenzamid und somit wie MS-275 ein Derivat des Benzamids. Es hemmt sehr spezifisch die HDACs 1, 2, 3 und 11 im nanomolaren oder niedrigem micromolaren Bereich für eine Dauer von 48 Stunden in vitro. Es hat keine Wirkung auf die HDACs der Klasse II (HDAC 4, 5, 6, 7,) und ebenfalls keine Wirkung auf HDAC 8 der Klasse I. Es führte zum Proliferationsstopp und zur Hyperacetylierung der Histone H3 und H4 in verschiedenen Tumorzelllinien. Der antiproliferative Effekt ist nahezu dreimal so groß wie der von MS-275. Es reduzierte Tumorwachstum sowohl in vitro als auch in vivo und führte dosisabhängig zur Apoptose in einer Reihe von Tumorzelllinien (Fournel et al. 2008).

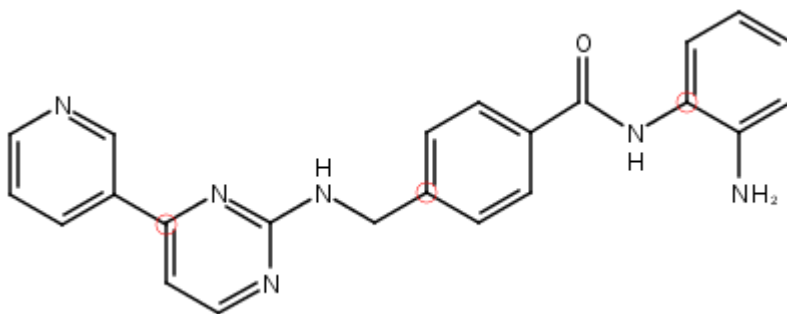


Abbildung 3: Strukturformel von MGCD0103. Erstellt nach (Atadja 2009).

1.6 Humane Stammzellen

Der Ersatz untergegangener Betazellen durch körpereigene Stammzellen beim Diabetes mellitus stellt einen vielversprechenden therapeutischen Ansatz in der Behandlung dieser chronischen Stoffwechselerkrankung dar. Eine Stammzelle ist durch ihre Fähigkeit zur Selbsterneuerung und Erzeugung von Nachkommen gekennzeichnet (Watt und Hogan 2000; Rekitke et al. 2016). Pluripotente, embryonale Stammzellen (ESC), die in alle drei Faltblätter und in Zellen der Keimbahn differenzieren, bieten eine vielversprechende

Möglichkeit zur Neubildung körpereigener Gewebe (Thomson et al. 1998). Demgegenüber steht jedoch eine in Mitteleuropa intensiv geführte Debatte um die ethischen Bedenken beim Umgang mit menschlichen Embryonen (Damschen und Schönecker 2003). In Deutschland ist die Herstellung von humanen Embryonen für Forschungszwecke gemäß des Embryonenschutzgesetzes verboten und limitiert hierzulande erheblich die Möglichkeiten der Regenerativen Medizin (Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz 13.12.1990).

1.6.1 Mesenchymale Stammzellen

Gemäß der International Society for Cellular Therapy ist eine mesenchymale Stammzelle (MSC) durch folgende Kriterien definiert. Sie müssen unter Standard Zellkulturbedingungen adhärent an Plastikoberflächen wachsen und die Oberflächenmarker CD105, CD73 sowie Thy-1/CD90 exprimieren. Die Oberflächenmoleküle CD45, CD34, CD14 oder CD11b, CD79alpha oder CD19 und HLA-DR dürfen nicht exprimiert sein. Außerdem muss die Fähigkeit gegeben sein, *in vitro* zu Adipozyten, Osteoblasten und Chondrozyten zu differenzieren (Dominici et al. 2006). Neben dem Oberflächenmarker Thy-1/CD90 exprimieren MSC außerdem noch den Stammzellofaktor (SCF) (Timper et al. 2006). Er wirkt als Ligand über den Kit-Rezeptor proliferativ und antiapoptotisch auf die Stammzellen (Smith et al. 2001). Der c-Kit Rezeptor ist in humanen fetalen Pankreaszellen exprimiert. Er wird während der Pankreasentwicklung in dynamischen Mustern reguliert und gilt als Marker für frühe Betazell- Progenitoren. Die parakrine Interaktion zwischen SCF und dem c-Kit Rezeptor während der fetalen Pankreasentwicklung führt zur Inselzellendifferenzierung und Proliferation (Li et al. 2006). Neben der Differenzierung in Adipozyten, Osteoblasten und Chondrozyten, also Zellreihen des mesodermalen Faltblatts, sind ebenfalls Transdifferenzierungen in Zellen beschrieben, die ihren Ursprung in einem anderen Keimblatt als dem Mesoderm haben (Jiang et al. 2002; Abdallah et al. 2005; Pittenger et al. 1999). So wurde gezeigt, dass Knochenmarksstammzellen, die in infarziertes Mäusemyokard appliziert wurden, *de novo* Myokardzellen generierten und somit ein verbesserter Outcome nach Myokardinfarkt erzielten. Dies bestätigte sich auch in ersten Studien am Menschen, bei denen die Injektion von Knochenmarksstammzellen in infarziertes Gewebe eine verbesserte Linksventrikuläre Pumpfunktion zur Folge hatte

(Orlic et al. 2003; Stamm et al. 2003). Auch in der neurologischen Forschung sucht man Anwendung von MSC für die Behandlung von degenerativen Erkrankungen wie die Parkinson- und Alzheimerkrankheit sowie bei der amyotrophen Lateralsklerose (ALS). MSC haben die Fähigkeit in Zellen des Nervensystems zu differenzieren. Die Applikation von MSC nach kontusiver Rückenmarksverletzung führte zu einer deutlichen Verbesserung der motorischen Funktion bei Ratten (Osaka et al. 2010; Tang et al. 2012b; Black und Woodbury 2001; Chang et al. 2014). Mesenchymale Knochenmarksstammzellen lassen sich zu renalen Zellen programmieren. Sie formten in vitro tubulusähnliche Strukturen und entwickelten Eigenschaften tubulärer Zellen wie z.B. das Binden und die Aufnahme von Albumin. Verpflanzte man diese Zellen in ein Mausmodell, welches ein akutes Nierenversagen entwickelte, so zeigte sich hier eine deutliche Reduktion des Nierenfunktionsverlustes und ein geringerer Schaden des Nephronsystems (Papadimou et al. 2015; Morigi et al. 2008). Neben einer Reihe weiterer Differenzierungsmöglichkeiten, wie z.B. die Entwicklung in Hepatozyten, lassen sich MSC auch in Zellen des sowohl exokrinen als auch endokrinen Pankreas lenken. Auf einige der Differenzierungsprotokolle, die dieses Ziel verfolgen wird im nächsten Kapitel eingegangen (Schwartz et al. 2002; Timper et al. 2006; Li et al. 2013).

Um adulte Stammzellen zu erhalten, kann man diese aus verschiedenen Geweben isolieren. Man findet sie beispielsweise im Skelettmuskel, in der Haut und Vorhaut, in den Speicheldrüsen, im Pankreas oder im Nabelschnurblut. Die Isolation aus diesen Geweben gestaltet sich aufgrund der anatomischen Gegebenheiten schwierig und teils nicht ertragreich (Bieback et al. 2004; Kern et al. 2006; Uezumi et al. 2016; Liu et al. 2016; Najar et al. 2016; Furukawa et al. 2015; Seeberger et al. 2006).

Als beste Quellen dieser MSC hat sich das Knochenmark und das Fettgewebe erwiesen. Die Extraktion der Zellen aus dem jeweiligen Gewebe erfolgt bei den Fettgewebsstammzellen (Adipose-tissue derived stem cells, ADSC) mittels Liposuktion und ist somit ein patientenschonendes Verfahren. Aus diesem Aspirat lassen sich ca. $2-6 \times 10^8$ Zellen gewinnen (Zuk et al. 2001; Zuk et al. 2002). Im Gegensatz dazu erfolgt die Isolation von Knochenmarksstammzellen über die Punktion des Beckenkamms, ein Verfahren, das trotz lokaler Anästhesie durchaus schmerzhaft und komplikationsbeladen ist. Die isolierten Zellen werden aufgrund ihrer Adhärenz in der Kultur separiert und expandiert (Nishimori et al. 2002; Haynesworth et al. 1992a; Haynesworth et al. 1992b; Pittenger et al. 1999).

Generell sind die Zellen aus den beiden Geweben bezüglich ihrer Biologie vergleichbar (Izadpanah et al. 2006). In Bezug auf ihr Wachstumsverhalten, die Zellalterung in der Kultur und ihre Differenzierungsfähigkeiten in Adipozyten und Osteoblasten zeigten sich keine signifikanten Unterschiede dieser Zellreihen (Ugarte et al. 2003). Bezüglich ihres Differenzierungspotentials zu endokrinen pankreatischen Zellen hatten sich Knochenmarksstammzellen jedoch als überlegen gezeigt. Sie entwickelten in einem Differenzierungszeitraum von 12 Tagen im Vergleich zu ADSC eine höhere Anzahl von inselzellartigen Clustern mit betazellspezifischen Transkriptionsfaktoren und unter Glukosestimulation eine signifikant höhere Insulinproduktion. Dies legt nahe, dass Knochenmarksstammzellen ein größeres Potential für die Transdifferenzierung in Richtung pankreatisches Gewebe und somit als Einsatzmöglichkeit beim Diabetes mellitus haben, als ADSC (Marappagounder et al. 2013).

1.7 Telomerase und Zellalterung

Für den adäquaten Ersatz von degenerativ verlorenen Zellen wird eine große Anzahl von Stammzellen benötigt (Shapiro et al. 2006). Während der Zellteilung unter langen Kultivierungszeiten entstehen kontinuierlich Veränderungen im Erbgut der einzelnen Stammzelle, sie büßt sukzessive ihr Differenzierungs- und Proliferationspotential ein. Nach einer bestimmten Anzahl von Zellteilungen *in vitro* nimmt die Proliferationsfähigkeit der Zellen ab, dies bezeichnet man im Englischen als „senescence“ also eine Art Zellalterung oder Zellvergreisung (Hayflick 1965; Sethe et al. 2006). Bei mesenchymalen Knochenmarksstammzellen zeigte sich ein frühes Einsetzen dieser Zellalterung während der Kultivierung *in vitro*. Schon nach sieben bis zwölf Passagen zeigten sich morphologische Veränderungen mit vergrößertem Zytoskelett, eine Reduktion stammzellspezifischer Oberflächenmoleküle und eine verminderte Differenzierungsfähigkeit zu Zellen der adipozytären Zellreihe. Auf Genebene zeigte sich eine Herunterregulation von Genen des Zellzyklus, der DNA-Replikation und -Reparatur (Wagner et al. 2008). Diese Veränderungen im Erbgut und in der Physiologie der Stammzellen beeinflussten durchaus den Nutzen dieser Zellen in der regenerativen Medizin (Wang et al. 2012; Sepulveda et al. 2014; Turinetto et al. 2016). Die Gründe für diese Zellalterung sind vielseitig (Hayflick 2007). Eine wichtige Ursache für diese Zellalterung ist eine Verkürzung der Telomere bei der Zellteilung. Die Enden der DNA

Stränge werden von repetitiven Oligonukleotidsequenzen der Nukleinbasen TTAGGG gebildet (Moyzis et al. 1988). Bei jeder Zellteilung verkürzen sich diese DNA-Enden, je nach Länge und Zelltyp um ca. 50-100 Basenpaare (Harley et al. 1990; Huffman et al. 2000). Eine Längenabnahme der Telomere ist mit einer Zellalterung assoziiert (Allsopp et al. 1992). Das Enzym Telomerase hilft die Telomere bei der Zellteilung zu stabilisieren. Es enthält einen intrinsischen Ribonucleinsäurestrang mit der Basenabfolge 5'-CUAACCCUAAC anhand dessen es die Telomersequenz am Ende der DNA-Stränge synthetisiert und somit einer Verkürzung vorbeugt (Greider und Blackburn 1985; Morin 1989; Feng et al. 1995). Die Aktivität dieses Enzyms ist auf embryonale Gewebe und Tumorzellen beschränkt und findet sich nicht in somatischen Zellen (Wright et al. 1996; Kim et al. 1994).

Mesenchymale Knochenmarksstammzellen, die mittels retroviralem Vektor eine Transduktion der katalytischen Untereinheit der Telomerase erhielten (human telomerase = hTERT) zeigten eine deutlich reduzierte Zellalterung im Vergleich zu Kontrollzellen. Während letztere eine durchschnittliche Populations-Verdopplungskapazität von 26 Passagen aufwiesen, bis eine Zellalterung und Proliferationsstopp eintrat, so war bei den transduzierten Zellen selbst nach über 260 Passagen noch eine deutliche Proliferation messbar. Diese Zellen behielten ihre Differenzierungsfähigkeit und formten keine Tumoren. Dies zeigte, dass eine ektope hTERT-Expression der Zellalterung von humanen mesenchymalen Stammzellen (hMSC) vorbeugt, und diese somit zu einem geeigneten Zellmodell für die Forschung und Etablierung von Differenzierungsprotokollen in der regenerativen Medizin macht (Simonsen et al. 2002).

1.8 Embryonalentwicklung des Pankreas

Die Bauchspeicheldrüse (Pankreas) liegt beim Menschen als kompaktes Drüsenorgan retroperitoneal im Oberbauch lokalisiert und besteht aus einem Kopf, einem länglichen Körper und einem Schwanzteil. Sie gliedert sich in einen exokrinen Anteil, der für die Sekretion von Verdauungsenzymen in das Duodenum zuständig ist, sowie in einen endokrinen Drüsenanteil, der aus gruppiert liegenden Zellen gebildet wird, den Insulae pancreaticae (Langerhans-Inseln). Diese machen lediglich einen Anteil von ca. 2 % des Organs aus und haben in ihrer Hauptfunktion die Regulation des Glucosestoffwechsels

inne. Innerhalb der Langerhans-Inseln lassen sich verschiedene Zelltypen unterscheiden. Der weitaus größte Anteil dieser Zellen sind die insulinproduzierenden Betazellen (ca. 70%), gefolgt von den Alphazellen (ca. 20%), die das blutzuckerhebende Hormon Glukagon produzieren. Die restlichen etwa 10 % der Zelltypen werden u.a. durch D-Zellen und PP-Zellen gebildet, deren Hormonprodukte keinen direkten Einfluss auf den Glukosestoffwechsel haben. Gestörte Betazellfunktionen und reduzierte periphere Wirkung ihres Hormonproduktes sind ursächlich für den Diabetes mellitus (Drenckhahn et al. 2004; Drenckhahn et al. 2003; Lüllmann-Rauch 2012).

Die embryonale Pankreasentwicklung ist in ihrem zeitlichen Ablauf und den einflussnehmenden differenzierungsrelevanten Faktoren anhand des Tiermodells, zum Beispiel bei der Ratte, gut untersucht. Die Entwicklung und Ausreifung des Organs gestaltet sich als ein biphasischer Prozess, der durch zwei Transitionen gekennzeichnet ist. Die erste Transition ist durch eine hohe Mitoserate gekennzeichnet, die durch schnelle Zellteilung zur Histogenese des Organs führt. Hier beginnen sich beim Rattenembryo am Tag E10.5 und E12.5 die Pankreasknospen durch weiteres Aussprießen in ein grobes duktales Gewebe zu verzweigen. Schon während dieses frühen Prozesses der Organentwicklung lassen sich Alphazellen und deren Hormon Glukagon nachweisen, sodass man eine Rolle dieses Zelltyps bei der Entwicklung des fertigen Organs vermutet. Die hohen Level an Glukagon erhalten sich während der gesamten Pankreasentwicklung. In der Phase der zweiten Transition wird die schnelle Zellproliferation durch die Differenzierungsphase der einzelnen Zellen abgelöst. Erst in dieser Phase ließ sich ein Anstieg des Hormons Insulin messen, der die geringen Insulinlevel am Anfang der Entwicklung ablöst (Rall et al. 1973). Ausdifferenzierte Betazellen konnten in der Ratte ab Tag E17 morphologisch anhand der β -Granula und Streptomycin-Sensitivität nachgewiesen werden (Rall et al. 1979; Rall et al. 1973; Pictet et al. 1972).

Beim Menschen entsteht die Bauchspeicheldrüse aus dem embryonalen Vorderdarm, aus dem, getriggert von verschiedenen Transkriptionsfaktoren, eine dorsale und eine ventrale Pankreasknospe auswachsen und sich später zu einem kompakten Organ vereinigen (Drenckhahn et al. 2003; Jennings et al. 2013). Der zeitliche Ablauf dieser Entwicklung beginnt beim Menschen ca. 22-26 Tage post-conceptionem (p.c.) und endet mit der Vereinigung der beiden Knospen ca. 53-58 Tage p.c.. Erste fetale Betazellen sind schließlich in der 10. Woche p.c. zu finden. Im Gegensatz zu den Zellen des exokrinen Pankreasgewebes, die sich durch Zellteilung voll ausdifferenzierter Zellen vermehren, ist

es bei den entstehenden Betazellen anders: Hier zeigte sich zunächst eine Proliferationsphase der Progenitorzellen, die dann von einer Differenzierungsphase und einem Proliferationsstopp abgelöst wurden (Castaing et al. 2005). Erste Inselzellstrukturen fanden sich ca. 13 Wochen p.c.. Sie vollzogen ihre Reifung und Größenzunahme im zweiten und dritten Trimester der Schwangerschaft bis zur Geburt (Jennings et al. 2013; O'Rahilly und Muller 2010; Piper et al. 2004).

Der Vorgang der endokrinen Pankreasentwicklung wird durch eine Reihe verschiedener Transkriptionsfaktoren gesteuert, deren phasenweise Aktivierung die einzelne Zellentwicklung koordiniert (Ahlgren et al. 1997). Zum Beispiel werden die Transkriptionsfaktoren NgN3, ISL1, NEURO D1, NKX2.2, Pax6 und NKX6.1 während der humanen Pankreasentwicklung zeitabhängig hochreguliert (Lyttle et al. 2008).

1.9 Differenzierungsfaktoren bei der Pankreasentwicklung

1.9.1 NeuroD

NeuroD gehört zur Familie der basic helix-loop-helix Transkriptionsfaktoren, tritt über diese Proteindomäne mit der DNA in Wechselwirkung und wird sowohl bei der pankreatischen, als auch bei der neuronalen Embryonalentwicklung exprimiert. Weiter findet es sich in einer Reihe pankreatischer Alpha- und Betazelllinien, und reguliert in letztgenannten die Insulinexpression (Naya et al. 1995; Cordle et al. 1991; Lee et al. 1995). NeuroD wird zum einen für die normale Langerhans-Inselzellentwicklung benötigt. Hier reguliert es, aktiviert durch Ngn3, v.a. die zu einem späten Zeitpunkt der Differenzierung, u.a. die morphologische Inselzellformation. Zum anderen reguliert es in adulten Betazellen die Glukosehomöostase. NeuroD-defiziente Mäuse entwickelten unmittelbar postpartal einen schweren Diabetes mellitus (Naya et al. 1997; Huang et al. 2000). Weiterhin steht NeuroD im engen Zusammenhang mit anderen, für die Pankreasentwicklung benötigten Transkriptionsfaktoren. Es aktiviert beispielsweise den Transkriptionsfaktor Pax6 und gliedert sich somit in ein Netz zusammenhängender transkriptionsrelevanter Faktoren ein (Marsich et al. 2003).

1.9.2 Pax6

Paired box 6 (Pax6) gehört zur Familie der Pax-Transkriptionsfaktoren und bindet die DNA mittels zweier Bindungsdomänen, der Paired box-Domäne und einer Homöodomäne. Durch diese Protein DNA-Wechselwirkung beeinflusst es als Transkriptionsfaktor die Regulation verschiedener Gene (Treisman et al. 1991; Treisman et al. 1992; Cvekl und Callaerts 2016; Glaser et al. 1994). Die Transkriptionsfaktoren der Pax-Familie nehmen eine Schlüsselrolle bei der Embryonalentwicklung verschiedener Organe, zum Beispiel des ZNS, der Niere, der Schilddrüse, des Immunsystems und des Pankreas ein (Torres et al. 1995; Urbanek 1994; Wilm et al. 1998; Mansouri et al. 1996; Turque et al. 1994). Pax6 hat sowohl bei der Embryonalentwicklung, als auch bei der Hormonproduktion des adulten, endokrinen Pankreas eine wichtige Funktion inne. Bei der Maus findet sich Pax6 schon früh (E9.5) kolokalisiert mit Glukagon, später auch zusammen mit Insulin, nicht jedoch im exokrinen Pankreasanteil. Eine Mutation im Pax6 Gen führte zur Reduktion endokriner Inselzellmasse bei gleichbleibender exokriner Zellmasse. Im adulten Pankreas wirkt Pax6 als Transkriptionsfaktor auf die Genexpression der endokrinen Hormone. Hier findet man den Transkriptionsfaktor in Alpha-, Beta- und Delta- und PP-Zellen exprimiert. Eine Gensequenz als Bindungsstelle für Pax6 findet sich im Promotorenbereich sowohl des Insulins, als auch des Glukagon und Somatostatin-Gens. Eine Mutation in der transkriptionsaktivierenden Domäne des Pax6 Gens führte hier zu einer Abnahme der Insulin und Glukagonproduktion der einzelnen Zelle bei gleichbleibender exokriner Zellfunktion (Sander et al. 1997; St-Onge et al. 1997).

Auch beim Menschen findet sich Pax6 ab der 8-21 Woche p.c. mit Insulin und Glukagon kolokalisiert, sodass auch hier eine Rolle bei der Entwicklung und Erhalt der endokrinen Funktion von Beta- und Alphazellen naheliegt (Lyttle et al. 2008).

1.9.3 ISL-1

Das Insulin-gene-enhancer binding Protein (ISL-1, Isl1) ist ein Transkriptionsfaktor der LIM-Homeobox-Familie. Weitere Vertreter dieser Transkriptionsfaktor-Familie sind MEC-3 und LIN-11, zwei Proteine, die als erstes bei dem Fadenwurm *Caenorhabditis elegans* gefunden wurden. Aus den Anfangsbuchstaben dieser Proteine, bei denen diese

spezielle Domäne zuerst entdeckt wurde, setzt sich der Name dieser Familie zusammen. Sie alle enthalten neben einer Homöodomäne eine weitere Struktur, die sich bei allen drei Proteinen sehr ähnelt: die LIM-Domäne. Diese besteht aus einer Aminosäurekette, die reichhaltig an Histidin und Cystein ist und die mit ihren Resten jeweils ein Zinkion koordinieren. Hierdurch ergibt sich die Struktur eines Tandem-Zinkfingers, welcher mit der DNA in Wechselwirkung treten kann (Karlsson et al. 1990; Kadrmaz und Beckerle 2004).

Bei der Maus findet sich ISL-1 ab dem Embryonaltag E9 im dorsalen pankreatischen Epithel, ab E9.5 koexprimiert mit Glukagon, Somatostatin, Insulin und dem Pankreatischen Polypeptid. Es wird bei der embryonalen Entwicklung des Pankreas speziell für die Ausbildung der dorsalen Pankreasanlage und aller endokrinen Zellreihen benötigt. ISL-1-defiziente Mäuse zeigten ein Ausbleiben der Ausbildung der dorsalen Pankreasanlage einhergehend mit fehlender exokriner Differenzierung des dorsalen Mesenchyms sowie einen vollständigen Verlust von Langerhans Zellen (Ahlgren et al. 1997).

Auch in der humanen Pankreasentwicklung beobachtet man eine Koexpression von ISL-1 mit Insulin und Glukagon v.a. in der 8-21 Woche p.c., was auch hier auf die Notwendigkeit dieses Transkriptionsfaktors für die Entwicklung endokriner Zellen schließen lässt (Lyttle et al. 2008). Weiter spielt ISL-1 eine wichtige Rolle bei der Entwicklung des Herzens und von Motoneuronen. Es wird für die Proliferation, Migration und das Überleben von kardialen Progenitorzellen benötigt und sorgt für die Reparatur von verletzten Motoneuronen. Bei der Pankreasentwicklung bindet ISL-1 an MafA, einem weiteren pankreatischen Transkriptionsfaktor, um seine Funktion auszuüben. Die direkte DNA-Bindestelle in der frühen Pankreasentwicklung ist z. Zt. jedoch noch nicht charakterisiert (Du et al. 2009; Bu et al. 2009; Cai et al. 2003; Pfaff et al. 1996).

Postnatal findet man ISL-1 beim Nagetier überwiegend im ZNS und in den Zellen der Langerhansinseln exprimiert (Dong et al. 1991; Thor et al. 1991). Hier übt es Einfluss auf die Produktion der endokrinen Hormone der Alpha-, Beta-, Gamma-, und Deltazellen und fördert deren Proliferation indem es direkt auf Zellzyklus regulierende Faktoren wie Cyclin D1, Cyclin D2, CDK4 und c-Myc wirkt. Es bindet hier als Transkriptionsfaktor an eine TAAT-Sequenz an den Promotoren dieser Gene. Weiter beeinflusst es direkt die

Transkription von MafA, bindet an diesen Faktor und übt so u.a. eine Funktion auf die Hormonproduktion aus (Du et al. 2009; Guo et al. 2011).

1.9.4 NKX6.1 und NKX2.2

Beide Transkriptionsfaktoren sind beim Menschen noch nicht im Endoderm exprimiert, jedoch während CS10 (25-27 p.c.) im Neuralrohr. Ab CS13 (30-33 p.c.) ist Nkx6.1 das erste Mal in der dorsalen Anlage messbar, Nkx2.2 bleibt weiterhin nicht detektierbar. Erst in der 10. Woche p.c. ist Nkx2.2 in den ersten fetalen B-Zellen messbar, wohingegen sich Nkx6.1 in der 14. Woche p.c. in den Betazellen finden lässt (Jennings et al. 2013).

Die Nkx2.2-Produktion findet beim Menschen ab der 8-21 Fetalwoche sowohl in Alphazellen als auch in Betazellen statt, wohingegen sich Nkx6.1 nur in insulinpositiven Zellen kolokalisiert findet was eine Rolle bei der Betazellentwicklung vermuten lässt (Lyttle et al. 2008). Dies wurde auch im Tiermodell bestätigt, in dem gezeigt wurde, dass Nkx6.1 die Glukagonexpression inhibierte und die Insulinproduktion förderte (Schisler et al. 2005).

Als Homeoprotein kontrolliert Nkx6.1 sowohl die neuronale als auch die pankreatische Entwicklung von Vorläuferzellen (Vallstedt et al. 2001; Briscoe et al. 2000; Rezania et al. 2013). Es wurde gezeigt, dass humane embryonale Stammzellen (hESC), die eine hohe Genexpression von Nkx6.1 aufwiesen, schneller zu insulinproduzierenden, glucoseresponsiven Zellen differenzieren konnten als Zellen mit nur geringer Nkx6.1-Expression. Außerdem enthielten diese endokrinen Zellen, welche aus der Population mit hohen Nkx6.1-Spiegeln differenzierten, deutlich höhere Insulinlevel. Die Nkx6.1 angereicherten hESC entwickelten sich nach Transplantation in die Nierenkapsel der Maus innerhalb von drei Monaten zu insulinproduzierenden Zellen (Rezania et al. 2013).

Im adulten Pankreasgewebe kontrolliert dieser Transkriptionsfaktor eine Reihe wichtiger Gene im Glukosemetabolismus, in der Insulinproduktion und nimmt Einfluss auf andere Transkriptionsfaktoren der Betazellentwicklung. Er wird für die glukoseabhängige Insulinantwort der Betazellen benötigt sowie für deren Proliferation. Letztlich führte eine Deletion des Nkx6.1 Gens in adulten Mäusen zur Entstehung eines Diabetes mellitus (Taylor et al. 2013).

1.10 Differenzierungsprotokolle zur Differenzierung mesenchymaler Stammzellen zu insulinproduzierenden Zellen

Die Entwicklung suffizienter Differenzierungsprotokolle für die Produktion insulinproduzierender Zellen aus allogenen Knochenmarksstammzellen stellt ein intensiv untersuchtes Feld der heutigen Stammzellforschung dar (Rekittke et al. 2016). Bis heute existieren eine Vielzahl von verschiedenen Differenzierungsprotokollen, die dieses Ziel verfolgen. Begonnen am Tiermodell bis hin zu Arbeiten an humanen embryonalen und mesenchymalen Stammzellen. Die meisten dieser Differenzierungsprotokolle versuchen die natürliche pankreatische Entwicklung vom Endoderm hin zur endokrinen Zelle mittels differenzierungsrelevanten Faktoren zu steuern und nachzuahmen (Rezania et al. 2014; Schulz et al. 2012; Best et al. 2008; D'Amour et al. 2006).

Ein großer Schritt in diese Richtung stellte die Entdeckung von pluripotenten embryonalen humanen Stammzellen dar, die in alle drei Faltblätter differenzieren konnten (Thomson et al. 1998). Erstmals gelang es D'Amour et al. 2005 ein effizientes Protokoll aufzustellen, um humane embryonale Stammzellen (hESC) zu definitivem Endoderm zu differenzieren und somit den ersten Schritt auf dem Weg zur Pankreasdifferenzierung einzuleiten (D'Amour et al. 2005).

Wenig später gelang es hESC zu hormonproduzierenden Zellen zu differenzieren, die nachweislich Insulin exprimieren konnten (D'Amour et al. 2006).

2012 konnten Rezania et al sowie die Arbeitsgruppe um Schulz et al. erstmalig Differenzierungsprotokolle entwickeln, die es schafften mehr als 90% Pdx1 positive und mehr als 60% Nkx6.1 positive pankreatische Endodermzellen zu generieren, die sich nach Transplantation in der Maus über einen gewissen Zeitraum zu insulinproduzierenden Zellen differenzieren konnten. Somit war es möglich in vitro definitives Endoderm und pankreatische Vorläuferzellen zu entwickeln, jedoch gelang es bis dato nicht funktionstüchtige Betazellen in vitro zu erhalten, die auf replikative Glucosegaben adäquat reagieren konnten (Rezania et al. 2012; Schulz et al. 2012).

Durch die sequentielle, auf die natürliche Betazellentwicklung angepasste Modulation multipler Signalwege konnte eine umfangreiche Produktion von funktionstüchtigen

humanen insulinproduzierenden Zellen aus humanen pluripotenten Stammzellen (hPSC), die adäquat über physiologische Signalkaskaden auf replikative Glucosestimulation reagieren konnten und Betazellmarker exprimierten, produziert werden. Eine solche glucosestimulierte Insulinsekretion (GSIS) wurde zuvor noch nicht erreicht (Pagliuca et al. 2014; Rezanian et al. 2014).

Jedoch stellt die begrenzte Verfügbarkeit und die ethischen Bedenken bezüglich einer Nutzung embryonaler Stammzellen eine Limitation dieser Möglichkeiten dar (Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz 13.12.1990).

1.10.1 HDACi in Differenzierungsprotokollen

Verschiedenen HDACi wurde nachgewiesen, dass sie durch ihre epigenetischen Modifikationen in der Lage sind, Differenzierungen von Zellen zu steuern. Sie können die Transkription unterschiedlicher Gene verstärkend oder inhibitorisch modulieren und werden in einer Reihe von Differenzierungsprotokollen, zurzeit noch überwiegend im Tiermodell, benutzt um bestimmte Differenzierungswege einzuleiten oder supportiv zu verstärken (Karantzali et al. 2008; Kurihara et al. 2014; Thatava et al. 2006; Yoo et al. 2006).

Im embryonalen Pankreas der Ratte sind die HDAC Klasse I (1-3) und II (4-7) exprimiert. Die Expression und Aktivität der Klasse I und Klasse II HDACs (außer HDAC 3) nimmt während der embryonalen Pankreasentwicklung der Ratte kontinuierlich von E13.5 bis zum adulten Pankreas ab. Damit einhergehend erhöht sich die Masse acetylierter Histone. Die Behandlung eines E.13.5 Rattenpankreas mit jeweils VPA und TSA, erhöhte die Anzahl von endokrinen Progenitorzellen. Unterschiede zwischen den beiden HDACi Klassen zeigten sich in fortgeschrittenen Entwicklungsstadien. Während die beiden Breitspektrum-inhibitoren TSA und Natriumbutyrat (NaB) den Anteil Pax4- und NeuroD positiver Zellen sowie die insgesamt Betazellmasse des Pankreas erhöhten, zeigten die spezifischeren HDACi VPA und MS-275 einen gegenteiligen Effekt: Im Vergleich zum Kontrollpankreas blieb die Anzahl insulinpositiver Zellen sehr gering (Haumaitre et al. 2008).

Die HDAC 1 führt u.a. zur Herunterregulation von PDX-1. Hier zeigen HDACi, die die HDAC 1 Wirkung inhibieren einen direkten Effekt auf die Insulinproduktion und

Wirkmöglichkeiten des bei der Embryonalentwicklung wichtigen Faktors (Park et al. 2008).

In kultivierten murinen pankreatischen Progenitorzellen erzielte die Applikation von NaB supportiv zu GLP-1, einem differenzierungsrelevanten Faktor, eine Zunahme von PDX-1 positiven Zellen. GLP-1 ist ein Inkretinhormon, das durch seine Wirkung Einfluss auf die Entwicklung in Richtung insulinproduzierender Zellen hat. Die alleinige Behandlung dieser Zellen mit NaB führte jedoch zu keiner signifikanten Genveränderung im Vergleich zu der Kontrollgruppe. Hier schien die Behandlung mit dem HDACi die Wirkung von GLP-1 durch epigenetische Modulation die Bindung von GLP-1 an die DNA zu erleichtern (Li et al. 2008; Suzuki et al. 2003).

Auch im Rahmen weiterer Differenzierungsprotokolle wurden HDACi wie NaB supportiv eingesetzt. In Kombination mit Activin A über drei Tage unterstützte NaB als Breitspektrum-inhibitor die Differenzierung von murinen mesenchymalen Fettstammzellen zu definitivem Endoderm, welches dann mittels weiterer Faktoren zu polyhormonalen Zellen weiterentwickelt werden konnte. Hier beeinflussten die HDACi gerade die Frühphase der Stammzellentwicklung und stellten somit eine durchaus nützliche Rolle im Einsatz von Differenzierungsprotokollen dar (Chandra et al. 2009).

Die momentane Datenlage zur Wirkung der neueren HDACi wie LBH589, MS-275 und MGCD0103 auf humane mesenchymale Stammzellen ist jedoch noch spärlich.

1.11 Ziele der Arbeit

Die Transplantation von insulinproduzierenden Zellen aus autologen Stammzellen gibt in präklinischen Studien Hoffnung auf eine neue Therapie des Diabetes mellitus Typ 1. Die körpereigene, möglichst physiologische Insulinproduktion zu reaktivieren könnte die Akut- und Langzeitkomplikationen einer exogenen Insulinapplikation reduzieren.

Ein suffizientes Differenzierungsprotokoll zur sicheren Entwicklung von Betazellen existiert zurzeit noch nicht. Es zeigen sich jedoch eine Reihe vielversprechender Ansätze. Einige dieser Protokolle benutzen HDACi supportiv, um Stammzellen in Richtung endokrines Pankreasgewebe zu primen.

Ziel dieser Arbeit ist es, den isolierten Effekt der neueren HDACi LBH589 (Panobinostat), MS-275 (Entinostat) und MGCD0103 (Mocetinostat) auf humane mesenchymale Stammzellen zu untersuchen und zu klären, ob diese Inhibitoren, welche sich im klinischen Einsatz als sicher erwiesen haben, auch in weiteren Differenzierungsprotokollen sinnvoll eingesetzt werden können.

Als Maß dafür, ob diese Substanzen in der Lage sind, eine endokrine Differenzierung einzuleiten, untersuchten wir die Expression der Transkriptionsfaktoren Pax6 und ISL-1 sowie die Veränderung der basal exprimierten Stammzellmarker SCF und Thy-1.

Eine Gefahr bei der Transplantation von Stammzellen ist die Entstehung maligner Tumoren aufgrund unkontrollierter Zellteilung. HDACi werden in der onkologischen Therapie aufgrund ihrer differenzierungsfördernden- und proliferationshemmenden Wirkung eingesetzt. In dieser Arbeit wollen wir ebenfalls den Effekt der o.g. Inhibitoren auf das Wachstumsverhalten der hMSC-TERT klären. Ein wachstumshemmender Effekt auf diese Zellen würde sich als zusätzlicher Nutzen dieser Substanzen darstellen.

2 Materialien

2.1 Zelllinie

hMSC-TERT = Humane mesenchymale Knochenmarksstammzelle, Telomerase-immortalisiert (als Geschenk erhalten von Prof. Dr.-Ing. Peter Czermak, THM Gießen)

2.2 Chemikalien

5 X First Strand Buffer	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
10 X PCR Buffer	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Boc-Lys(Ac)-AMC	Bachem (Bubendorf, Schweiz)
Coral load PCR Buffer	Qiagen (Hilden, Deutschland)
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
DNase I	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
DNase reaction buffer	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
Doppelt destilliertes H ₂ O (ddH ₂ O, Aqua bidest)	Aus Biocel A10 Millipore Water purification System
DTT 0.1 M	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
dNTPs Mix 10mM	Roche (Basel, Schweiz)
EDTA 25mM	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
Essigsäure 100%	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
Glycerol	Merck KGaA (Darmstadt, Deutschland)
LBH58951 (Panobinostat)	Selleckchem (Houston, USA)
L-Glutamin 100X	Life technologies (Darmstadt, Deutschland)
MassRuler DNA Ladder	Thermo Scientific (Waltham, USA)

MgCl ₂	Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)
MGCD0103 (Mocetinostat)	Selleckchem (Houston, USA)
MS-275 (Entinostat)	Selleckchem (Houston, USA)
NaCl	Roth (Karlsruhe, Deutschland)
Natriumdeoxycholat	Sigma-Aldrich (St.Louis, USA)
NP-40	United States Biological (Swampscott, USA)
Oligo (dT) primers	Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)
PBS 10X	Lonza (Verviers, Belgien)
PegGreen	peqlab (Erlangen, Deutschland)
Penicillin/Streptomycin	Life technologies (Darmstadt, Deutschland)
Q-Solution	Qiagen (Hilden, Deutschland)
RNase-free water	Gibco (Darmstadt, Deutschland)
SDS	Bio-Rad (München, Deutschland)
Superscript III reverse Transkriptase	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
SYBR Green	FMC Bioproducts (Rockland, USA)
Taq DNA-Polymerase	Qiagen (Hilden, Deutschland)
Titriplex	Merck (Darmstadt, Deutschland)
TRIS base	Merck (Darmstadt, Deutschland)
TRIS HCl	Sigma (München, Deutschland)
Trypan blue 0,4%	Nano Entek (Guro-gu, Seoul, Korea)
Trypsin-EDTA 1X 0,05%,	Life technologies (Darmstadt, Deutschland)

2.3 Puffer und Lösungen

10 X DNase reaction Buffer	Invitrogen (Darmstadt, Deutschland)
Enzym-Lysispuffer	121 mg Tris-base, 58 mg NaCl, 29 mg MgCl, 100 µl NP-40, 100 ml destilliertes Wasser
Fetal Calf Serum(FCS)	Biowest (Nuaille, Frankreich)
HDAC Assay Buffer 10X	Abcam (Cambridge, USA)
Lysispuffer ERA	10 mM Tris base, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl ₂ , 0,1 % NP-40 pH 7.4
Master mix (cDNA Synthese)	4 µl 5 X First strand buffer, 2 µl 0.1 M DTT, 1 µl mM dNTPs, 1 µg µl ⁻¹ oligo dTs, 1 µl Superscript III Reverse Transcriptase
Minimum essential Medium (MEM)	Life technologies (Darmstadt, Deutschland)
NP-40 Puffer nach abcam	0,8 g Na Cl, 10 ml Glycerol, 1 ml NP-40, 2 ml EDTA (100 mM), 100 ml Tris- HCL (pH = 8,0).
Proteinassaylösung	Bio-Rad, München, Deutschland
Proteinstandard 2 mg/ml	Sigma-Aldrich, St. Louis, USA
RIPA Puffer	438 g NaCl, 0,25 g Natriumdeoxycholat, 0,05 g SDS, 5 ml NP-40 (10%), 50 ml Trispuffer (50 mM, pH = 8,0)
TAE Puffer (1X):	60,5 g TRIS Base, 14,28 ml Essigsäure (1M), 4,65 g EDTA, 250 ml RNase freies Wasser

2.4 Kits

BD Stemflow™ Hmsc Analysis Kit	BD Biosciences (Franklin Lakes, USA)
Power SYBR Green PCR Master Mix	Applied Biosystem (Darmstadt, Deutschland)
RNeasy Plus Micro Kit	Qiagen (Düsseldorf, Deutschland)

2.5 Laborequipment / Verbrauchsmaterialien

Cellstar Tubes 15 ml, blue caps	Greiner bio-one (Frickenhausen, Deutschland)
Cell counting slide (Juli BR)	Nano Entek (Seoul, Korea)
Micro Amp Fast reaction Tubes	Applied biosystems (Foster City, USA)
Micro Amp Optical 8-Cap Strip	Applied biosystems (Foster City, USA)
Mikrotestplatte, 96-well	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Mikrotestplatte, 96-well, schwarz	Greiner bio-one (Frickenhausen, Deutschland)
PCR Tube 0,2 ml	Eppendorf AG (Hamburg, Deutschland)
Pipettenspitzen 10 µl, 200 µl 1000 µl	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Reagenzgefäß 2 ml und 0,5 ml,	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Reagenzgefäß SafeSeal 1,5 ml	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)
Reagenzgefäß schwarz Rotilabor	Carl Roth GmbH (Karlsruhe, Deutschland)
Cellstar cell culture Flasks, (500 ml, 175 cm ²)	Greiner Bio-one (Frickenhausen, Deutschland)
Zellkulturschalen (60 mm x 15 mm)	Sarstedt (Nümbrecht, Deutschland)

2.6 Verwendete Geräte

Brutschrank Heraeus B 5028	Heraeus Holding GmbH (Hanau, Deutschland)
FACS Canto™	BD Biosciences (Franklin Lakes, New Jersey, USA)
Horizontale Gelelektrophoresekammer	Keutz Labortechnik (Reiskirchen, Deutschland)
Julii™ BR live cell movie analyzer	Nano Entek (Seoul, Korea)
Julii Br Cell counting module	Nano Entek (Seoul, Korea)
Kulturschrank hera cell	Thermo Electron Corporation (Waltham USA)
Microplate Reader Mithra LB940	Berthold (Bad Wildbad, Deutschland)
Mikrowelle MW-17	AFK Germany (Hamburg, Deutschland)
Milli-Q Biocel A10 Reinstwasseranlage	Merck Millipore (Billerica (Massachusetts, USA)
Microplate Reader Mithra LB940	Berthold (Bad Wildbad, Deutschland)
Real-Time PCR System StepOnePlus	Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)
Spectrophotometer NanoDrop 1000	Thermo Scientific (Schwerte, Deutschland)
Sterile Arbeitsbank	Thermo Scientific (Schwerte, Deutschland)
Thermal cycler DOPPIO	VWR (Darmstadt, Deutschland)
Vortex mixer	neoLab Migge (Heidelberg, Deutschland)
Vilber Lourmat Chemi-smart	Vilber Lourmat (Eberhardzell, Deutschland)
Zentrifuge Universal 32 R	Hettich Zentrifugen (Tuttlingen, Deutschland)
Zentrifuge Heraeus Biofuge 13	Heraeus (Hanau, Deutschland)

2.7 Software

FACS DIVA Version 6.1.3	BD Biosciences (Franklin Lakes, New Jersey, USA)
Graph Pad Prism 5	GraphPad Software (San Diego, USA)
Step One Software	Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland)
Strukturformelprogramm SketchEl-1.62	frei erhältlich unter (Stand 14.04.2017) http://sourceforge.net/projects/sketchel
Microsoft Excel	Microsoft (Redmond, Washington, USA)
Microsoft Word	Microsoft (Redmond, Washington, USA)
Microsoft Power Point	Microsoft (Redmond, Washington, USA)

3 Methoden

3.1 Zellzählung

Die Zellzählung wurde mit dem JuLI™ Br live cell movie analyzer (Nano Entek, Seoul, Korea) mittels JuLI Br Cell counting module (91-JUBRCM, Nano Entek) durchgeführt. Zur Zählung erfolgte die Ablösung der Zellen mittels Trypsin-EDTA und anschließendem Waschschrift mit PBS. Danach wurden die Zellen in PBS resuspendiert und gevortext. 10 µl Zellsuspension wurden mit 10 µl Trypan blue 0,4% (Nano Entek, Guro-gu, Seoul, Korea) in einem 0,5 ml Reagiergefäß verdünnt und durch wiederholtes Pipettieren ausgiebig vermischt. Dann erfolgte das Pipettieren von 10 µl der verdünnten Lösung auf ein Cell counting slide (JuLI™ Br, NanoEnTek). Die Anzahl der vitalen Zellen konnte nun mittels dem JuLI™ Br live cell movie analyzer ausgewertet werden. Zellen, die Trypan Blue aufnahmen wurden als tote Zellen gekennzeichnet.

3.2 Konfluenzmessung

Die Konfluenzmessung unter Kontrollbedingungen und unter Inhibitorbehandlung wurde mittels Julim BR live cell movie analyzer (Nano Entek, Seoul, Korea) durchgeführt.

3.3 Durchflusszytometrische Zellcharakterisierung

Die durchflusszytometrische Untersuchung der verwendeten Zelllinie diente der genaueren Charakterisierung und Bestätigung der verwendeten Zelle als mesenchymale Stammzelle.

Im FACS Canto™ passierten einzelne Zellen einen Laserstrahl. Anhand der Lichtstreuung ließ sich auf Zellgröße- und Granularität schließen. Gebeugtes Licht, welches auf der Achse des Lichteinfalls gemessen wurde, wird als Vorwärtsstreulicht (Forward Scatter, FSC) bezeichnet. Es ließ auf die Größe der Zelle schließen und verhielt sich hierzu proportional. Reflektiertes und gebrochenes Licht wurde als Seitwärtsstreulicht (Side Scatter, SSC) gemessen und verhielt sich proportional zur Granularität der Zelle.

Zusätzlich konnte durch antikörpergebundene Fluoreszenzmarkierung eine spezielle Untersuchung der Oberflächenstruktur von Zellen erfolgen. Die antikörpergebundenen Fluorochrome hatten nach BD Bioscience folgende Absorptions- und Emissionsspektren: Fluorescein Isothiocyanat (FITC, Absorptionsmaximum (Ex-max) = 494 nm, Emissionsmaximum (Em-max) = 520 nm), Peridin-Chlorophyll-Proteinkomplex und Cyaninfarbstoff (PerCP-Cy5.5., Ex-max = 482 nm, Em-max = 676 nm), Allophycocyanin (APC, Ex-max = 650 nm, Em-max = 660 nm), Phycoerythrin (PE, Ex-max = 496 nm, Em-max = 578 nm). Sie wurden durch einfallendes Laserlicht erregt, Elektronen wechselten hieraufhin auf ein höheres Energieniveau und fielen spontan zurück. Es wurde Fluoreszenzlicht in der entsprechenden Wellenlänge abgegeben und konnte vom Gerät detektiert werden. Das emittierte Licht war proportional zu den an der Zelloberfläche gebundenen Fluorochromen.

Obige Fluorochrome wurden in unserem Versuch an Antikörper gegen CD90, CD105, CD73, (Positive Cocktail) sowie CD34, CD11b, CD19, CD45, HLA-DR (Negative Cocktail) gebunden.

Es wurde der BD Stemflow™ Hmsc Analysis Kit (BD Biosciences, USA) verwendet. Zur Zellcharakterisierung nutzten wir hieraus:

1. hMSC Positive Cocktail: CD90 FITC (Clone: 5E10), CD105 PerCP-Cy5.5 (Clone: 266), CD73 APC (Clone: AD2)
2. hMSC Positive Isotype Control Cocktail: mIgG1, κ FITC (Clone: X40), mIgG1, κ PerCP-Cy5.5 (Clone: X40), mIgG1, κ APC (Clone: X40)
3. PE hMSC Negative Cocktail: CD34 PE (Clone:581), CD11b PE (Clone: ICRF44), CD19 PE (Clone: HIB19), CD45 PE (Clone: HI30), HLA-DR PE (Clone: G46-6)
4. PE hMSC Negative Isotype Control Cocktail: mIgG1, κ PE (Clone: X40), mIgG2a, κ PE (Clone: G155-178)

Zunächst wurden die Zellen nach einmaliger bzw. fünfmaliger Zellpassagierung in den Zellkulturflaschen mittels Trypsin abgelöst. Es folgte ein zweimaliger Waschschrift mit PBS. Dann erfolgte pro 700.000 Zellen die Zugabe von jeweils 20 µl der o.g. Antikörperlösungen in unterschiedliche 15 ml Cellstar[®] Tubes:

Tube	Antikörper
1	Ungefärbte Zellen
2	hMSC Positive Isotype Control Cocktail + PE hMSC Negative Isotype Control Cocktail
3	hMSC Positive Cocktail + PE hMSC Negative Cocktail

Tabelle 3: Gliederung der durchflusszytometrischen Analyse. Übersicht über die benutzten Kit-Bestandteile des BD Stemflow™ Hmsc Analysis Kit, aufgeteilt in drei Tubes, die jeweils 700.000 Zellen enthielten und zur durchflusszytometrischen Untersuchung in angegebener Reihenfolge genutzt wurden.

Nach einer 30-minütigen Inkubationszeit im Dunkeln und auf Eis wurde in jedes Tube 1 ml PBS hinzugegeben, 5 min bei 300 G zentrifugiert und der Überstand verworfen. Nach Vortexen wurde dann in jedes Tube 400 µl PBS hinzugegeben. Die fertige Lösung wurde nun zur Messungen im BD FACS Canto genutzt. Dieses besaß zur Anregung der Fluorochrome einen blauen und einen roten Laser. Zur Auswertung der Messungen wurde die Software FACS DIVA Version 6.1.3 verwendet.

Die einzelnen Proben wurden in o.g. Reihenfolge analysiert. Mittels Tube 1 wurde das Zellanalysefeld („Gate“, P1) anhand von Zellgröße und Granularität der Stammzelllinie mittels forward scatter (FSC-A) und side scatter (SCC-A) bestimmt. Für die weitere Untersuchung wurde mittels dem Positive und Negative Isotype Control Cocktail die Quadrantenmarker Q1 - 4 gesetzt (s. Abb. 4). Dann erfolgte die Analyse der Oberflächenmoleküle mit Tube 3 mittels dem Positive und Negative Cocktail innerhalb des zuvor festgelegten „Gates“.

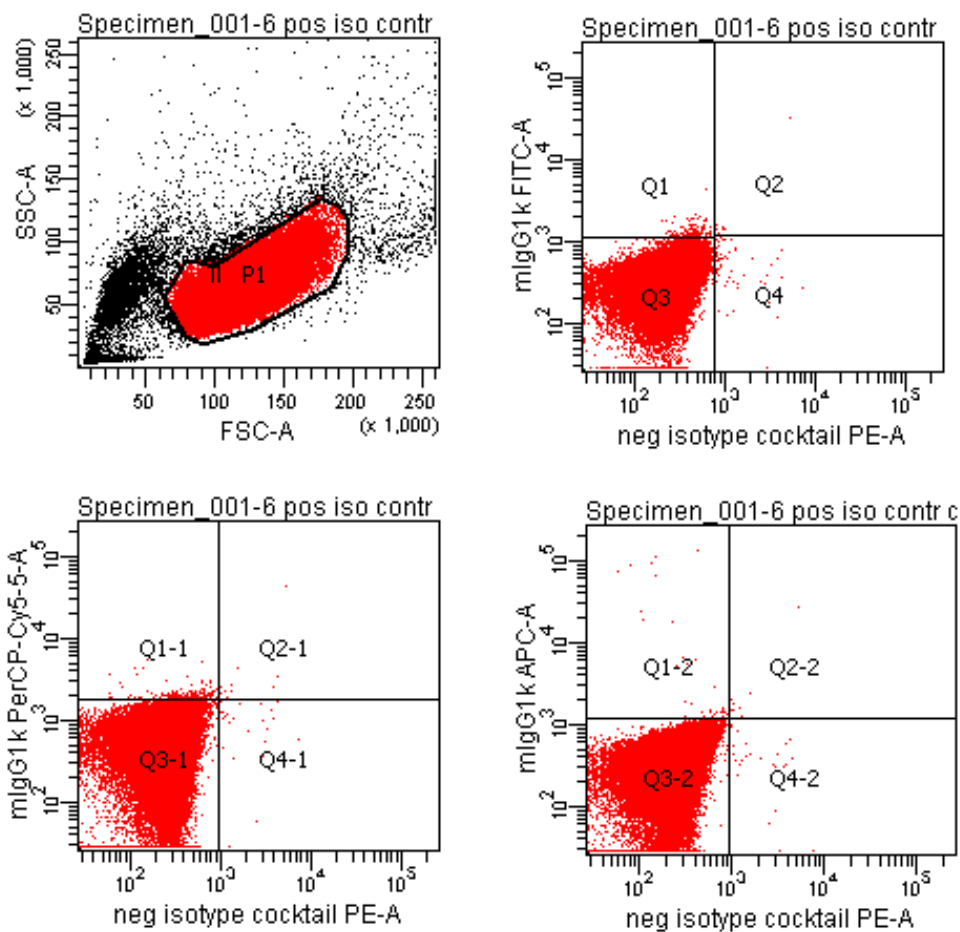


Abbildung 4: Festlegung der Quadrantenmarker mittels Positive Isotyp Control und Negative Isotype Control Cocktail aus dem BD Stemflow™ Hmsc Analysis Kit.

3.4 Kultivierung der humanen mesenchymalen Stammzellen

Die Kultivierung der hMSC-TERT Zellen erfolgte mittels Minimum essential Medium)

mit 11% Fetal Calf Serum, 1,1% L-Glutamin 100x und 1% Penicillin/Streptomycin in 500 ml/175cm² Zellkulturflaschen. Pro Zellkulturflasche erfolgte die Zugabe von 20 ml Medium. Die Kultivierung erfolgte in einem Zellkulturschrank bei 37°C und 5% CO₂-Gehalt. Das Zellsplitting wurde bei 70-80% Zellkonfluenz durchgeführt. Hierzu erfolgte das Auswaschen des Zellkulturmediums mittels PBS, das Ablösen der Zellen vom Boden der Zellkulturflaschen mit Trypsin-EDTA und die anschließende Neuaussaat mit einer Zelldichte von 5×10^3 - 1×10^4 Zellen /cm². Die hMSC-TERT Zellen wuchsen plastikadhärent.

Nach dreimaliger Zellpassagierung erfolgte die Aussaat von $2-5 \times 10^5$ Zellen auf 60 x 15 mm Zellkulturschalen mit einer Wachstumsoberfläche für sensitive adhärent wachsende Zellen, bei einer Zugabe von 2 ml Medium.

Hier erfolgte die Kultivierung mittels o.g. Kulturmedium und die Zugabe von den HDACi Panobinostat (LBH58951), Entinostat (MS-275), Mocetinostat (MGCD0103) gelöst in DMSO.

3.5 20 tägige Zellkultur mit HDACi-Behandlung zur Probengewinnung von HDAC-Enzymen für den HDAC-Aktivitätsassay.

Es erfolgte die Behandlung der hMSC-TERT Zelllinie mit o.g. HDACi

Die Behandlung der hMSC-TERT mit den jeweiligen HDACi erfolgte über 20 Tage mit täglichem Mediumwechsel unter Zugabe des Inhibitors.

Die Zellen wurden in den folgenden Inhibitor-Endkonzentrationen behandelt:

- i) LBH589: 100 nM, 50 nM, 20 nM, 5 nM, 2 nM, 0 nM (0 nM = Kontrolle = nur DMSO)
- ii) MS-275: 6 µM, 3 µM, 1,5 µM, 0,5 µM, 0,2 µM, 0 µM (0 µM = Kontrolle = nur DMSO)
- iii) MGCD0103: 5 µM, 1,66 µM, 0,29 µM, 0,15 µM, 0,075 µM, 0 µM (0 µM = Kontrolle = nur DMSO)

Die Zellen wurden in den Zellkulturschalen mit einem Mediumvolumen von 2 ml kultiviert. Von diesen 2 ml Medium wurden jeweils 4 µl abpipettiert und durch insgesamt

4 µl Inhibitorlösung plus DMSO in den jeweilig benötigten Konzentrationen ersetzt. Die Kontrollzellen (0 nM bzw. 0 µM) wurden nur mit 4 µl DMSO versetzt. Eine Null-Stunden Kontrolle wurde weder mit Inhibitor noch mit DMSO versetzt.

Da 4 µl in 2 ml Medium gegeben wurden (1 :500 verdünnt), musste die Inhibitor-Vorverdünnung 500fach konzentriert sein. Dies wird kurz anhand des HDACi Entinostat demonstriert: In dem Voransatz musste eine Konzentration von 3000 µM, 1500 µM, 850 µM, 255 µM, 100 µM, 0 µM vorliegen, damit die Endkonzentration den oben genannten entspricht. Somit musste die Entinostat Stock-Lösung (10 mM = 10000 µM) im Verhältnis 1 :3,33 verdünnt werden (mit DMSO), sodass dann von dieser Verdünnung 4 µl in das Zellmedium pipettiert werden konnte, um die Endkonzentration von 6 µM zu erhalten. Analog hierzu erfolgten die Pipettierungsschritte der anderen Inhibitoren und Konzentrationen.

Ein Mediumwechsel wurde täglich durchgeführt und die einzelnen Inhibitorkonzentrationen täglich neu pipettiert und frisch angesetzt.

Zu den Zeitpunkten null Stunden (Kontrolle, vollständig unbehandelte Zellen), fünf Minuten, 15 Minuten, 30 Minuten, 6 Stunden, 12 Stunden, 24 Stunden, 48 Stunden, fünf Tage, 10 Tage, 15 Tage und 20 Tage erfolgte ein Zellkulturabbruch, der mittels der Zugabe von NP-40 Zellysepuffers zur Lyse der Zellen und zur Isolierung der zelleigenen Proteine durchgeführt wurde.

3.6 Herstellung der Zellysate / Proteinisolation

Die Herstellung der Zellysate für den HDAC- Aktivitätsassay erfolgte mit dem NP-40 Puffer. Hierzu wurde auf Eis gearbeitet. Zunächst erfolgte ein zweimaliges Waschen der Zellen mit PBS. Daraufhin wurde pro Zellkulturschale 200 µl NP-40 Puffer hinzugegeben und durch pipettieren wiederholt über die gesamte Zellkulturschale verteilt. Dann wurden die Zellen in SafeSeal Reagiergefäße abpipettiert, gevortext und 20 min auf dem Eis belassen. Dann erfolgte nach erneutem Vortexen eine 20-minütige Zentrifugation bei 12.000 Umdrehungen/min und 4 °C. Der Überstand, welcher die Proteine enthielt, wurde anschließend isoliert und bei -80 °C gelagert.

3.7 Puffersysteme

Im Vorfeld wurden vier verschiedene Puffersysteme getestet: RIPA- Puffer, Era Lysepuffer, NP-40 Puffer, Enzymlysepuffer. Der NP-40 Puffer erbrachte hier die größte Proteinausbeute und wurde somit für den endgültigen Versuch im HDAC-Assay verwendet.

Im Folgenden werden die Puffersysteme kurz anhand ihres Herstellungsprotokolls erläutert.

Der NP-40 Puffer nach abcam war in unserem Labor bereits etabliert. Zur Herstellung von 100 ml NP-40 Puffer benötigt man 0,8 g NaCl, 10 ml Glycerol, 1 ml NP-40 sowie 2 ml EDTA (100 mM). Dies wurde mit Tris- HCL (pH 8,0) auf ein Endvolumen von 100 ml aufgefüllt. Tris-HCL (20 mM) wurde mittels 0,315 g Tris-HCl in 100 ml bidest Wasser auf einen pH von 8,0 eingestellt. Der EDTA Ansatz wurde mit 0,93 g Tritriplex in 20 ml destilliertem Wasser mittels NaOH auf einen pH von 7,4 eingestellt und dann auf 25 ml mit doppelt destilliertem Wasser verdünnt. Das fertige NP-40 Puffersystem bestand aus 20 mM Tris-HCL, pH 8, 137 mM NaCL, 10% Glycerol, 1% NP-40, 2 mM EDTA.

Auch der RIPA Puffer (Radioimmunoprecipitation assay buffer) war in unserem Labor bereits etabliert. Zur Herstellung von 50 ml Pufferansatz benötigte man 0,438 g NaCl, 0,25 g Natriumdeoxycholat, 0,05 g SDS, 0,5 ml NP-40. Dies füllte man mittels Trispuffer (50 mM, pH 8,0) auf insgesamt 50 ml auf. Der Tris-Puffer bestand aus 0,606 g Tris base auf 100 ml destilliertes Wasser aufgefüllt.

Der Enzymlysepuffer wurde hergestellt aus 121 mg Tris-base, 58 mg NaCl, 29 mg MgCl₂, 100 µl NP-40 und mittels destilliertem Wasser auf ein Endvolumen von 100 ml aufgefüllt.

Der Era-Lysepuffer besteht aus 10 mM Tris base, 10 mM NaCl, 3 mM MgCl₂, 0,1 % NP-40 (Non-idet P-40), auf einen pH von 7.4 eingestellt.

3.8 Bestimmung der Proteinmenge in den Zelllysaten

Das Prinzip der Proteinbestimmung besteht darin, dass sich nach Bindung von Coomassie brilliant blue G-250 an ein Protein dessen Lichtabsorptionsmaximum von 465 nm nach 600 nm Wellenlänge verschiebt. Eine vorverdünnte Standardreihe mit bekannten

Proteinkonzentrationen diente hier als Vergleichsreihe zu den noch unbekanntem Proteinkonzentrationen der jeweiligen Proben.

Die Standards in den Konzentrationen 0,0 mg/ml bis 1,0 mg/l wurden hergestellt, indem der Sigma Proteinstandard 2 mg/ml mit doppelt destilliertem Wasser verdünnt wurde. Die Vorverdünnung der Proteinlysate erfolgte im Verhältnis 1:2. Pro Well wurde 10 µl Standard bzw Lysat pipettiert. Anschließend erfolgte die Zugabe von 200 µl 1:5-verdünnter Proteinassaylösung und das Auslesen der Probe bei 600 nm im Mithras LB 940 Multitechnologie Mikroplattenleser.

3.9 HDAC-Aktivitätsversuch

Der HDAC-Aktivitätsversuch diente der Untersuchung, ob in den isolierten Proteinanteilen HDAC-Enzyme vorliegen, und ob diese noch funktionell waren. In diesem Fall kam es zur Fluoreszenzentstehung. Die mit HDACi behandelten Zelllysate sollten somit weniger Fluoreszenzemission zeigen. Als zentraler Baustein dieses Versuchs diente das Substrat Boc-Lys(Ac)-AMC (I-1875, BACHEM, Bubendorf, Schweiz). Von diesem Substrat kann nach Deacetylierung durch eine HDAC mittels Trypsin ein fluoreszierender Rest, 7-amino-4-methylcoumarin (AMC), abgespalten werden. Nach Zugabe eines HDAC-Assay-Puffers sowie Trypsin kam es durch obig beschriebene Reaktion zur Lichtemission. Diese wurde anschließend, nach zehnstündiger Inkubationszeit, mittels eines Elisareaders ($E_x = 360$ nm, $E_m = 460$ nm) gemessen (Mithras LB 940 Multitechnologie Mikroplattenleser, Berthold Technologies, Bad Wildbad, Deutschland).

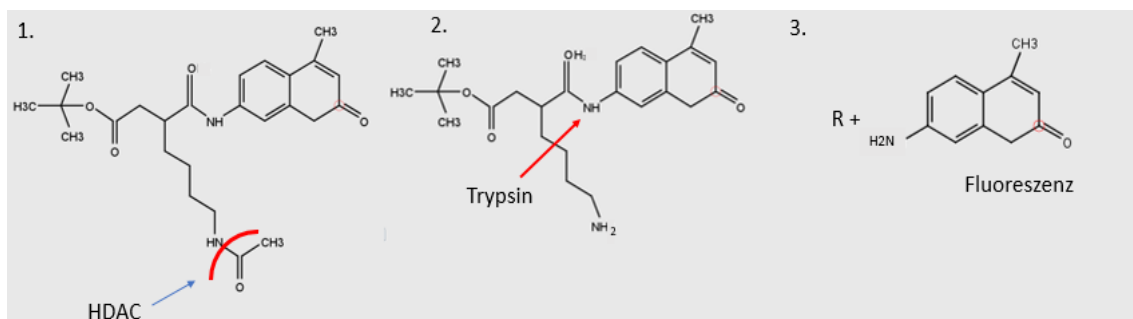


Abbildung 5: HDAC-Assay Prinzip. Das Substrat Boc-Lys(Ac)-AMC wird in einem ersten Schritt durch funktionstüchtige HDAC Enzyme aus dem Zelllysate deacetyliert (1). Anschließend kann das Substrat durch Trypsin gespalten werden (2). Hierdurch wird das

Fluorochrom 7-amino-4-methylcoumarin (AMC) freigesetzt. Versuchsprinzip nach (Wegener et al. 2003) Abb. Erstellt mittels Strukturformelzeichnungsprogramm SketchEl-1.62.

Der Versuch wurde auf einer schwarzen 96-Well Mikrottestplatte durchgeführt. Zunächst erfolgte das Pipettieren von 150 μM Boc-Lys(Ac)-AMC Substrat zusammen mit 20 μg Proteinlysate verdünnt mit ddH₂O bei einem Volumen von 100 μl /well. Anschließend erfolgte die Inkubation des Versuchansatzes bei 37 °C für 35 min in einem Brutschrank Inkubator. Hierauf folgend wurden insgesamt 50 μl Reaktionslösung, bestehend aus Trypsin (1,5 mg/ml), 1 X HDAC Puffer (10%) und ddH₂O (90%) hinzugefügt. Anschließend erfolgte eine erneute Inkubation bei 37 °C. Endpunkt der Inkubation war nach zehn Stunden. Hier erfolgte die Fluoreszenzmessung im Mikroplattenleser ($E_x = 360$ nm, $E_m = 460$ nm).

wells	1-3	4-6	7-9	10-12
A	5min, 6 μM	15min, 1.5 μM	30min, 0.2 μM	6h, 6 μM
B	5min, 3 μM	15min, 0.5 μM	30min, 0 μM	6h, 3 μM
C	5min, 1.5 μM	15min, 0.2 μM	60min, 6 μM	6h, 1.5 μM
D	5min, 0.5 μM	15min, 0 μM	60min, 3 μM	6h, 0.5 μM
E	5min, 0.2 μM	30min, 6 μM	60min, 1.5 μM	6h, 0.2 μM
F	5min, 0 μM	30min, 3 μM	60min, 0.5 μM	6h, 0 μM
G	15min, 6 μM	30min, 1.5 μM	60min, 0.2 μM	Ohne Zelllysate
H	15min, 3 μM	30min, 0.5 μM	60min, 0 μM	Panobinostat

wells	1-3	4-6	7-9	10-12
A	12h, 6 μM	24h, 1.5 μM	48h, 0.2 μM	10d, 6 μM
B	12h, 3 μM	24h, 0.5 μM	48h, 0 μM	10d, 3 μM
C	12h, 1.5 μM	24h, 0.2 μM	5d, 6 μM	10d, 1.5 μM
D	12h, 0.5 μM	24h, 0 μM	5d, 3 μM	10d, 0.5 μM

E	12h, 0.2 μ M	48h, 6 μ M	5d, 1.5 μ M	10d, 0.2 μ M
F	12h, 0 μ M	48h, 3 μ M	5d, 0.5 μ M	10d, 0 μ M
G	24h, 6 μ M	48h, 1.5 μ M	5d, 0.2 μ M	Ohne Zelllysate
H	24h, 3 μ M	48h, 0.5 μ M	5d, 0 μ M	Panobinostat

wells	1-3	4-6	7-9	10-12
A	15d, 6 μ M	20d, 1.5 μ M		
B	15d, 3 μ M	20d, 0.5 μ M		
C	15d, 1.5 μ M	20d, 0.2 μ M		
D	15d, 0.5 μ M	20d, 0 μ M		
E	15d, 0.2 μ M	Ohne Zelllysate		
F	15d, 0 μ M	Panobinostat		
G	20d, 6 μ M			
H	20d, 3 μ M			

Tabelle 4: Pipettierschema des HDAC-Assays. Beispiel anhand des Pipettierschemas des HDAC Aktivitätsassays für den HDACi Entinostat (MS-275) auf einer schwarzen 96-well Platte: Die einzelnen Zeitpunkte und Konzentrationen wurden in je drei wells pipettiert. Jeder Versuchsaufbau wurde insgesamt dreimal durchgeführt. Als Positivkontrollen dienten zu jedem Zeitpunkt 0 μ M (unbehandelte) Zellen. Zusätzlich wurde auf jeder Platte eine Negativkontrolle durchgeführt: Nach Pipettieren von unbehandelten Zellen wurde in hoher Konzentration (3mM) LBH589 (Panobinostat) hinzupipettiert. Die Wells ohne Zelllysate zeigten das „Hintergrundrauschen“ der am Versuch beteiligten Substanzen, sowie den Spontanzerfall des Substrates.

3.10 Vorversuchsreihen zum HDAC-Aktivitätsassay

3.10.1 Wahl eines geeigneten Lysepuffer und Festlegung einer optimalen Lysatmenge

Der Lysepuffer diente in meinen Versuchen der Lyse der Stammzellen und der möglichst schonenden Extraktion funktionstüchtiger HDAC-Enzymen. Vier verschiedene Puffer wurden getestet:

1. RIPA Puffer
2. NP-40 Puffer nach abcam:

3. Era Lysepuffer
4. Enzym-Lysepuffer

Ziel bei der Wahl eines geeigneten Lysepuffers war eine möglichst hohe Proteinextraktion und eine hohe Fluoreszenzintensität im späteren Assay. Die Festlegung einer geeigneten Lysatmenge für den späteren Assay erfolgte ebenfalls anhand des Kriteriums einer hohen Fluoreszenzintensität. Je höher die Fluoreszenz unter Kontrollbedingungen, desto besser ließ sich bei späterer Enzyminhibition ein Unterschied zwischen verschiedenen HDACi-Konzentrationen erkennen.

wells	1-3	4-6	7-9	10-12
A	RIPA ohne Zellen	NP-40 ohne Zellen	Era ohne Zellen	Enzym-Puffer ohne Zellen
B	RIPA 20 µg hMSC-Tert ohne Substrat	NP-40 20 µg hMSC-Tert ohne Substrat	Era 20 µg hMSC-Tert ohne Substrat	Enzym-Puffer 20 µg hMSC-Tert ohne Substrat
C	RIPA 20 µg hMSC-Tert ohne Trypsin	NP-40 20 µg hMSC-Tert ohne Trypsin	Era 20 µg hMSC-Tert ohne Trypsin	Enzym-Puffer 20 µg hMSC-Tert ohne Trypsin
D	RIPA 10 µg hMSC-Tert	NP-40 10 µg hMSC-Tert	Era 10 µg hMSC-Tert	Enzym-Puffer 10 µg hMSC-Tert
E	RIPA 20 µg hMSC-Tert	NP-40 20 µg hMSC-Tert	Era 20 µg hMSC-Tert	Enzym-puffer 20 µg hMSC-Tert
F	RIPA 30 µg hMSC-Tert	NP-40 30 µg hMSC-Tert	Era 30 µg hMSC-Tert	Enzym-Puffer 30 µg hMSC-Tert
G	RIPA 40 µg hMSC-Tert	NP-40 40 µg hMSC-Tert	Era 40 µg hMSC-Tert	Enzym-Puffer 40 µg hMSC-Tert
H	RIPA 50 µg hMSC-Tert	NP-40 50 µg hMSC-Tert	Era 50 µg hMSC-Tert	Enzym-Puffer 50 µg hMSC-Tert

Tabelle 5: Pipettierschema für Lysepuffer- und Lysatbestimmung. Es wurden die vier verschiedenen Puffersysteme RIPA- Puffer, NP40 Puffer, Era-Lysepuffer und der Enzymlysepuffer getestet. Es wurden unterschiedliche Mengen an Zelllysaten (hMSC-TERT) in die Wells pipettiert. Zur Kontrolle diente die Zeile A, in welche keine Zelllysate pipettiert wurden.

Die Substratkonzentration wurde hierbei auf 150 µM festgesetzt. Pro well wurden 5 µl Substrat pipettiert. Die Substratstocklösung hatte eine Konzentration von 30 mM = 30.000 µM, somit erfolgte eine Verdünnung von 1:10. Pro Well wurden 0,5 µl Substrat

mit destilliertem Wasser auf 5 µl aufgefüllt. Auch die Trypsinlösung war mit 1,5 mg/ ml festgesetzt. Die Versuchsdurchführung entspricht dem obig dargestellten HDAC-Assay. Das Ablesen der Fluoreszenzintensität erfolgte hier nach 15 min, 30 min, 60 min und 120 min.

3.10.2 Festlegung einer geeigneten Boc-Lys(Ac)-AMC Substratmenge

Die Testung verschiedener Boc-Lys(Ac)-AMC Substratmengen diente dazu, eine Konzentration zu finden, bei der ein möglichst hohes Fluoreszenzsignal messbar wurde.

Die Zellysate wurden mittels NP-40 Puffer (s.o.) hergestellt. Die Proteinmenge wurde auf 30 µg/ Well festgesetzt und gemäß dem unten abgebildeten Schema nur in die jeweiligen Wells pipettiert und mit ddH₂O auf 85 µl pro Well aufgefüllt. Die Wells ohne Proteinlysate enthielten somit nur 85 µl ddH₂O. In jedes Well wurden zusätzlich 10 µl 10X HDAC Puffer pipettiert. Die Substratlösungen wurden dann nur in die jeweiligen Wells pipettiert in den zu testenden Konzentrationen: 0 µM, 100 µM, 150 µM, 200 µM, 300 µM.

Um passende Endkonzentrationen der Substratlösung in dem jeweilig enthaltenen Volumen pro well zu erhalten wurde nach folgenden Arbeitsschritten vorgegangen:

Die Stocklösung enthielt 30 mM Substrat in DMSO (= 13,37 mg/ ml DMSO). Durch die Zugabe von 5 µl Substratlösung in insgesamt 100 µl pro well wurde die Substratlösung 1:20 verdünnt, d. h., dass der Verdünnungsansatz 20 x höher sein musste als die gewünschte Endkonzentration des Substrates:

- Endkonzentration = 0 µM □ Verdünnungsansatz = 0 mM
- Endkonzentration = 100 µM □ Verdünnungsansatz = 2 mM
- Endkonzentration = 150 µM □ Verdünnungsansatz = 3 mM
- Endkonzentration = 200 µM □ Verdünnungsansatz = 4 mM
- Endkonzentration = 300 µM □ Verdünnungsansatz = 6 mM

Da in dem Versuchsaufbau zur Substrattestung pro Substratverdünnung jeweils 12 Wells bestückt wurden, wurde insgesamt 60 µl jeder Verdünnungsstufe gebraucht. Um Pipettierbarkeit zu gewährleisten wurden 90 µl angesetzt.

Verdünnungsansatz (mM)	benötigte Verdünnung	Substratstock (30mM) (µl)	Aqua bidest (µl)	Endkonz. Im well (µM)
0	---	---	90	0
2	1:15	6	84	100
3	1:10	9	81	150
4	1:7,5	12	78	200
6	1:5	18	72	300

Tabelle 6: Verdünnungsschema zum Erreichen der gewünschten Endkonzentration des Substrates im Versuchsaufbau der Substrattestung. Die Substratstocklösung besaß eine 30 mM Konzentration. Durch entsprechendes Verdünnen mit doppelt destilliertem Wasser (Aqua bidest) wurden die erforderlichen Endkonzentrationen erreicht.

Das Versuchsprinzip entsprach dem oben dargestellten HDAC-Assay. Es erfolgte das Aufstellen einer schwarzen 96-Well Platte (Tabelle 7) mit obig angegebenen Substratkonzentrationen zusammen mit verschiedenen Kontrollbedingungen (folgende Konzentrationen immer inklusive HDAC Assay-Puffer): 1. Fluoreszenz nur unter Trypsin und HDAC-Assay-Puffer. 2. Fluoreszenz bei alleinigem HDAC-Assay Puffer. 3. Fluoreszenz nur unter 30 µg Zelllysate und Trypsin. 4. Fluoreszenz unter 30 µg Zelllysate (alles in der ersten Zeile A). Im Anschluss wurden die Substrattestungen in den Zeilen B-D pipettiert. In den Reihen 7-9 fanden sich die Vergleiche der einzelnen Substratkonzentrationen. Die Reihen 1-3 waren Kontrollen ohne Lysat. Die Reihen 4-6 waren Kontrollen ohne Lysat und ohne Trypsin, und stellten somit das „Hintergrundrauschen“ des Boc-Lys(Ac)-AMC Substrates dar. Die Reihen 10-12 waren Kontrollen die ohne die Zugabe von Trypsin durchgeführt wurden, somit war hier die Fluoreszenz messbar, die durch spontanen Zerfall des desacetylierten Substrates entstand, ohne die aktive Spaltung durch Trypsin.

Wells	1-3	4-6	7-9	10-12
A	∅ Lysat ∅ Substrat + Tryp.	∅ Lysat ∅ Substrat - Tryp.	hTert Lysat ∅ Substrat + Tryp	hTert Lysat ∅ Substr. - Tryp
B	∅ Lysat 100µM Substrat + Tryp	∅ Lysat 100µM Substrat - Tryp	hTert Lysat 100µM Substrat + Tryp.	hTert Lysat 100µM Substr. - Tryp
C	∅ Lysat 150µM Substrat + Tryp.	∅ Lysat 150µM Substrat - Tryp.	hTert Lysat 150µM Substrat + Tryp.	hTert Lysat 150µM Substr. - Tryp.
D	∅ Lysat 200µM Substrat + Tryp.	∅ Lysat 200µM Substrat - Tryp.	hTert Lysat 200µM Substrat + Tryp.	hTert Lysat 200µM Substr. - Tryp.
E	∅ Lysat 300µM Substrat + Tryp	∅ Lysat 300µM Substrat - Tryp.	hTert Lysat 300µM Substrat + Tryp.	hTert Lysat 300µM Substr. - Tryp.
F				
G				
H				

Tabelle 7: Pipettierschema zur Testung einer geeigneten Substratmenge. Verschiedene Konstellationen wurden getestet. Es erfolgten die Substrattestungen in aufsteigenden Konzentrationen in den Zeilen B-D. In den Reihen 7-9, ab Spalte B fanden sich die Vergleiche der Substratkonzentrationen in Konstellation des eigentlichen Versuchsaufbaus. Die Reihen 1-3 waren Kontrollen ohne Lysat. Die Reihen 4-6 waren Kontrollen ohne Lysat und ohne Trypsin, und stellten somit das „Hintergrundrauschen“ des Ac-Arg-Gly-Lys(Ac)-AMC Substrates dar. Die Reihen 10-12 waren Kontrollen die ohne die Zugabe von Trypsin durchgeführt wurden.

Nach dem Pipettieren der Platte erfolgte eine abgedunkelte, 30-minütige Inkubation bei 37 °C, hier konnten die HDACs das Substrat deacetylieren. Dann erfolgte die Zugabe von 50 µl Trypsinlösung (1,5 mg/ml) in die jeweiligen Wells.

Daraufhin erfolgte erneut eine abgedunkelte Inkubation der Platte mit Fluoreszenzmessung im Elisareader nach 15 min, 30 min, 45 min, 60 min, 90 min, 120 min, 180 min, 270 min, 1230 min.

3.11 Untersuchung der Genexpression

3.11.1 RNA-Isolation und photometrische Konzentrationsbestimmung

Die Zellyse und RNA-Extraktion erfolgte nach Herstellerangaben mittels RNeasy Plus Micro Kit (Qiagen, Düsseldorf, Deutschland). Die anschließende Bestimmung der RNA-Konzentration und Qualität erfolgte mit dem NanoDrop 1000 Spectrophotometer (Thermo Scientific, Schwerte, Deutschland)

3.11.2 cDNA-Synthese

Die cDNA Synthese wurde in dem Thermal cycler DOPPIO durchgeführt.

Zunächst wurde 1 µg RNA in einem PCR-tube mit RNase-freiem Wasser auf ein Volumen von 8 µl aufgefüllt und 1 µl DNase I sowie 1 µl 10 X DNase reaction Buffer hinzugegeben. Eine 15-minütige Inkubation bei 37 °C führte zur Verdauung der DNA. Anschließend wurde 1 µl 25 mM EDTA hinzugegeben und bei 65 °C für 20 Minuten inkubiert und anschließend auf 5 °C abgekühlt. In einem dritten Schritt wurde nun 9 µl Master Mix, bestehend aus 4 µl First Strand Buffer, 2 µl 0,1 M DTT, 1 µl 10 mM dNTP Mix, 1 µl 0,5 µg/µl Oligo d(T), 1 µl Superscript III reverse Transkriptase und 1 µl 0,5 µg/µl Oligo d(T), hinzugefügt. Es erfolgte dann die Behandlung des Probenansatzes im Cyclischen Thermocycler bei einer 50-minütigen Inkubation bei 50 °C, gefolgt von 15 Minuten bei 72 °C. Die entstandene cDNA wurde im Verhältnis 1:20 mit RNase-freiem Wasser verdünnt.

3.11.3 Real-time PCR

Die quantitative real-time PCR wurde mit dem Real-time PCR System StepOnePlus von Applied Biosystems (Darmstadt, Deutschland) durchgeführt.

Das Prinzip der Real-time PCR basiert auf dem unten beschriebenen Prinzip im Abschnitt der Polymerasekettenreaktion. Im Gegensatz zu herkömmlichen PCR-Verfahren wurde hier in Echtzeit (Real-time) durch Fluoreszenzmessung (mittels SYBRGreen) eine Quantifizierung der amplifizierten DNA-Abschnitte durchgeführt, innerhalb der exponentiellen Phase der PCR.

Die Versuche wurden in Micro Amp Fast reaction Tubes pipettiert, und mit Micro Amp Optical 8-Cap Strip verschlossen, bevor sie in das real-time PCR-System gegeben wurden.

Pro Tube wurden 3 μ l cDNA (1:20 verdünnt) mit einer Primer-Lösung, bestehend aus 6,4 μ l RNase-freiem Wasser, 10 μ l SYBRGreen (Applied Biosystems, Darmstadt, Deutschland) und 0,6 μ l Primer zu einem Endvolumen von 20 μ l aufgefüllt. Als Negativkontrolle diente 3 μ l RNase freies Wasser zusammen mit der Primer-Lösung.

Die Initiation der Amplifikation erfolgte durch eine 10-minütige Inkubation bei 95 °C. Anschließend erfolgten 40 Zyklen aus Denaturierung (95 °C), Primerhybridisierung und Elongation (60 °C). Für jeden Durchlauf wurden Schmelzkurven erstellt.

Die Auswertung erfolgte mittels $\Delta\Delta$ CT Methode mit Excel und dem Statistikprogramm Prism, es wurden insgesamt 6 (n = 6) Durchgänge pro zu untersuchendem Gen vorgenommen, die Signifikanztestung erfolgte mit dem Kruskal-wallis Test, dem Dunn's Multicomparison Test und dem Kolmogorov- Smirnov Test.

Gene	Accession	Size	Forward Primer	Reverse Primer
RPL13A	NM_012423	126 bp	cctggaggagaagaggaaagaga	ttgaggacctctgtgtattgtcaa
Thy-1	NM_001311 160	112 bp	atgaaggtcctctacttatccgc	gcactgtgacgttctggga
SCF	M59964.1	222 bp	ggtggcaaatcttccaaaa	tcttcacgcactccacaag
ISL-1	NM_002202. 2	75 bp	caactggtcaattttcagaagga	ttgagaggacattgatgctactc ac
Pax6	NM_000280. 4	187 bp	ttgcagcctacattccctga	gggtctccaaagtctctgct

Tabelle 8: Darstellung der verwendeten Primer. Übersicht anhand ihrer Accession-Number, der Produktgröße in Basenpaaren (bp) und Auflistung der Basensequenzen des Vorwärts- (forward primer) und Rückwärtsprimer (revers primer).

Die Primer für Thy-1, SCF, ISL-1 und Pax6 wurden mittels Primerblast bei pubmed.com (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/>, Stand 13.04.2017) berechnet und mittels primer3plus (<http://primer3.de/cgi-bin/dev/primer3plus.cgi>, Stand 13.04.2017) überprüft. Diese Programme berechneten hochspezifische, auf das Gen zugeschnittene Primersequenzen. Wir haben somit eine Primereffizienz von 1 angenommen.

3.11.4 Testen der Stabilität der Haushaltsgene

Zur genauen Expressionsanalyse der Zielgene war ein stabiles Haushaltsgen (housekeeping gene, HKG) obligat. Es wurden insgesamt 12 häufig verwendete HKG überprüft. Ziel war es das HKG zu finden, welches unter einer fünftägigen Behandlung mit LBH589 die stabilsten Expressionswerte besaß.

Gene	Accession	Size	Forward	Reverse
ACTB	NM_001101.2	233 bp	ggacttcgagcaagagatgg	agcactgtgtggcgtacaag
B2M	NM_004048.2	87 bp	tgctgtctccatgtttgatgtatct	tctctgctccccacctctaagt

GAPD	NM_002046.2	238 bp	gagtcaacggatttggtcgt	ttgattttggaggatctcg
GUSB	NM_000181.1	171 bp	aaacgattgcagggtttcac	ctctcgtcggtgactgttca
HPRT1	NM_000194.1	94 bp	tgacactggcaaaacaatgca	ggtccttttcaccagcaagct
PGK	NM_000291.2	198 bp	ctgtgggggtatttgaatgg	cttcaggagctcctcaactg
PP1A	NM_021130.2	158 bp	ttcatctgcactgccaagac	tcgagttgtccacagtgcgc
TBP	NM_003194.3	170 bp	tataatccaagcggtttgc	gctggaaaaccaacttctg
TFRC	NM_003234.1	210 bp	cgctggtcagttcgtgatta	gcattcccgaatctgttgt
YWHAZ #1	NM_003406	183 bp	agcttttgatgaagccattg	gaggcagacaaaagttggaa
YWHAZ #2	NM_003406	234	catcatgacattgggtagca	gagtggagccagaaagatca

Tabelle 9: Übersicht über die verwendeten HKG. Die HKG aus Zeile 1-9 sowie RPL13A entstammten dem Housekeeping Gene Primer Set von Biomol GmbH. YWHAZ #1 und #2 wurden separat bei Biomol in Auftrag gegeben. RPL13A ist nicht mit aufgeführt, da es in Tab. 8 dargestellt ist.

3.11.5 Polymerase-Kettenreaktion und Agarose- Gelelektrophorese

Die Polymerasekettenreaktion (PCR) wurde genutzt, um Gensequenzen, die durch die jeweiligen Primer festgelegt waren, zu vervielfältigen. Hierzu nutzte man die zuvor hergestellte cDNA. In jeweils ein 0,2 ml PCR-Tube wurde dann 2,8 µl Coral Load Buffer, 0,5 µl dNTP mix sowie 0,4 µl Taq DNA Polymerase und 20 µl RNase freies Wasser gegeben. Die jeweiligen Primer wurden gevortext und dann wurde je ein Primerpaar (fw + rev) in das dazugehörige 0,2 ml Tube gegeben. Abschließend erfolgte die Zugabe von 1 µl cDNA in jedes Tube, sodass nun ein Endvolumen von 25 µl vorlag.

Jetzt wurden die PCR-Tubes in den Thermal cycler DOPPIO VWR (Darmstadt, Deutschland) gegeben. Das Prinzip der PCR bestand darin, dass die cDNA- Abschnitte durch zyklische Prozesse vervielfältigt wurden. Zunächst erfolgte ein Erhitzen der Proben auf über 90 °C um die cDNA Stränge voneinander zu trennen. Dann erfolgte nach Abkühlen des Thermocyclers das Anlagern der Primer an die DNA-Einzelstränge bei ca.

60 °C. In einem dritten Schritt erfolgte die Polymerisation der DNA Stränge. Diese Prozesse erfolgten wiederholt und führten somit zur Amplifikation der cDNA Stränge.

3.11.6 Herstellung eines Agarosegels und Gelelektrophorese

Die Agarose-Gelelektrophorese diente dazu, die zuvor in der PCR erhaltenen Produkte auf einem Gel sichtbar zu machen und deren Basenpaar-Größe zu bestimmen um, zu bestätigen, dass eine zuvor gewünschte Gensequenz durch die verwendeten Primer gebunden und vervielfacht wurde.

Zur Herstellung eines Agarosegels wurde TAE Buffer (1X) benötigt. Dieser musste zuvor angesetzt werden. Für 250 ml TEA Buffer (50X) benötigte man 60,5 g TRIS Base, 14,28 ml Essigsäure (1 M) und 4,65 g EDTA. Dies wurde mit RNase freiem Wasser auf 250 ml aufgefüllt.

Für ein 1,75% iges Agarosegel gab man 1,75 g Agarose in 100 ml TAE Buffer (1X). Dies wurde in der Mikrowelle erhitzt, bis sich der Zucker vollständig gelöst hatte. Anschließend wurde die Flüssigkeit wieder abgekühlt und mit 5 µl Peggreen versetzt. Dieses diente dazu, die PCR Produkte später unter UV-Licht sichtbar zu machen.

Dann konnte die Flüssigkeit in die Gelkammer gegossen werden. Es wurde eine horizontale Gelelektrophoresekammer (Keutz Labortechnik, Reiskirchen, Deutschland) verwendet. Vor dem Aushärten wurde ein 8er Kamm am Anfang des Gels platziert. Pro Kammer wurden 50 ml Flüssigkeit gegossen. Dann ließ man das Gel vollständig aushärten. Danach konnte der Kamm entfernt werden. Die hierdurch entstehenden „Taschen“ wurden als Ladestellen der zu untersuchenden PCR Produkte genutzt. Die restliche Gelkammer wurde mit TAE Puffer (1X) aufgefüllt.

Die beiden äußeren „Taschen“ wurden jeweils mit 5 µl MassRuler DNA Ladder Mix aufgefüllt. Die anderen „Taschen“ wurden dann mit jeweils 15 µl Proben aus der PCR befüllt. Im Anschluss daran wurde an die Kammer eine elektrische Spannung angeschlossen, bei 100 V erfolgte die Elektrophorese für ca. zwei Stunden. Anhand der Mas ruler mix ladder konnte man zwischenzeitlich überprüfen, wie weit die Produkte auf dem Gel gelaufen sind. Nach ca. zwei Stunden wurde die Kammer vom Stromnetz

entfernt, und das Gel wurde herausgenommen. Anschließend wurden die einzelnen Banden mithilfe der Vilber Lourmat Kammer unter UV-Licht sichtbar gemacht.

3.11.7 Statistische Auswertung

Die statistische Auswertung wurde mit dem Statistikprogramm Prism durchgeführt. Die Daten sind grafisch als Mittelwert (MW) \pm mittlerer Fehler des Mittelwertes (SEM) dargestellt.

Zur Varianzanalyse beim Vergleich multipler Gruppen wurde der Kruskal-Wallis Test verwendet, als post-hoc Test wurde Dunn's multiple Comparisonstest genutzt. Es wurde ein Signifikanzniveau von $p \leq 0,05$ angenommen. Zum Vergleich zweier Zeitpunkte wurde der Kolmogorov-Smirnov Test verwendet. Bei sämtlichen statistischen Auswertungen dieser Arbeit wurde keine Gauß-Verteilung der erfassten Daten angenommen, da die höchste Anzahl der Versuchsdurchgänge sechs betrug ($n = 6$ mit $N=3$).

4 Ergebnisse

4.1 Durchflusszytometrische Zellcharakterisierung

Nach der International Society for Cellular Therapy ist eine mesenchymale Stammzelle u.a. über ihre charakteristischen Oberflächenmoleküle definiert. Sie müssen die Oberflächenmarker CD105, CD73 sowie Thy-1/CD90 exprimieren. Die Oberflächenmoleküle CD45, CD34, CD14 oder CD11b, CD79alpha oder CD19 und HLA-DR dürfen nicht exprimiert sein (Dominici et al. 2006)

Die initial durchgeführte durchflusszytometrische Untersuchung diente der genaueren Charakterisierung der verwendeten Zelllinie. Hier zeigten sich 99,1% der Zellen aus der untersuchten Population (P1) positiv für den Oberflächenmarker CD90 (Abb. 6, Q1). Zudem exprimierten 79,1 % der Zellen CD105 (Abb. 6, Q1-1) und wiederum 99% das Oberflächenmolekül CD73 (Abb. 6, Q1-2). Weniger als 2% der Zellen exprimierten die Oberflächenmarker CD45, CD34, CD11b, CD19, HLA-DR (Abb. 6., negative cocktail PE-A).

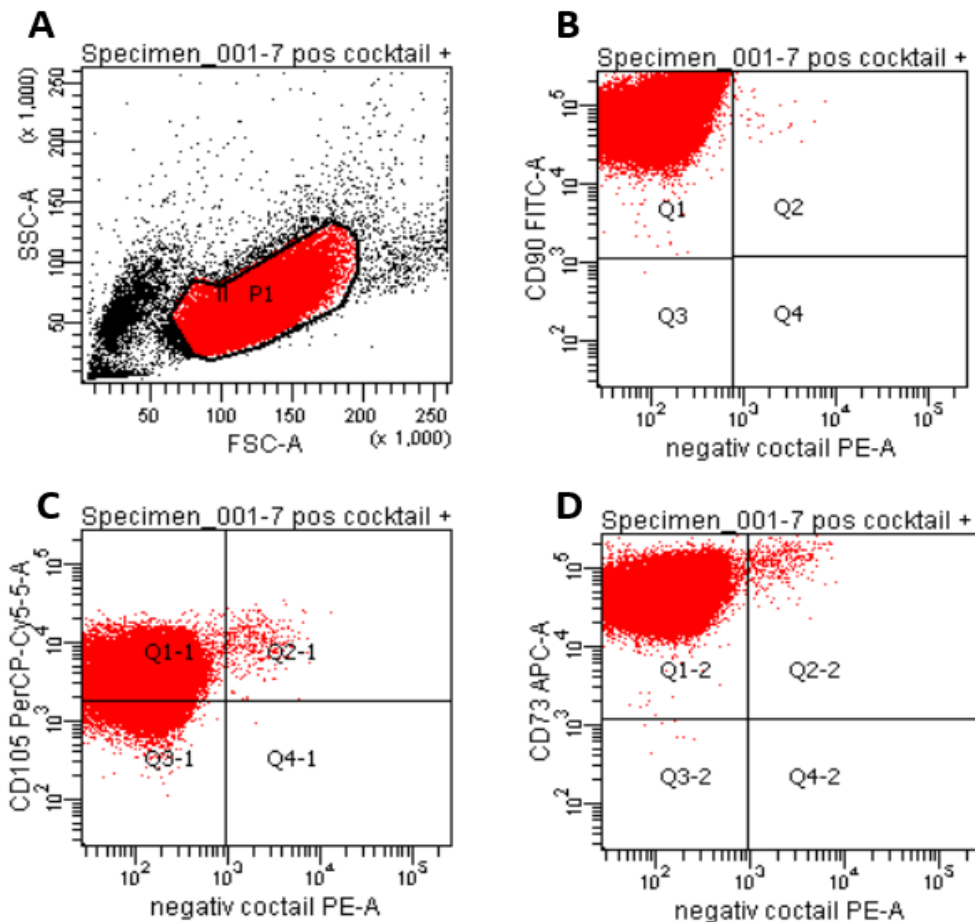


Abbildung 6 Durchflusszytometrische Zellcharakterisierung. Untersucht wurde die verwendete humane, mesenchymalen Stammzelllinie. Untersuchung nach eintägiger Zellkultur unter Standardbedingungen und ohne Zellpassagierung (P0). A: Festlegung des Zellanlysefeldes („Gate“) anhand von Zellgröße und Granularität der Stammzelllinie mittels forward scatter (FSC-A) und side scatter (SSC-A). B: Expression des Oberflächenmarkers CD 90, gemessen mittels eines Antikörpers, der an das Fluorochrom FITC (Fluorescein Isothiocyanat) gekoppelt war. Die zuvor durch Negativkontrollen bestimmten Quadrantenmarker teilen das Feld in 4 Sektionen ein. In der Sektion Q1 und Q2 fanden sich Zellen, die das Oberflächenmolekül CD90 trugen. Auf der X-Achse abgebildet findet sich der „negativ control cocktail“, dieser besteht aus Antikörpern, die an CD34, CD11b, CD19, CD45 und HLA-DR gebunden haben und an das Fluorochrom Phycoerythrin gekoppelt waren. Zellen innerhalb der Sektion Q2 und Q4 exprimierten Vertreter dieser Oberflächenmarker. Zellen in den Sektionen Q1 und Q3 exprimierten diese Marker nicht. Zellen in Sektion Q3 sind sowohl negativ für CD90 als auch für alle Oberflächenmarker des „negativ cocktails“. Somit fanden sich in Sektion Q1 Zellen, die positiv für CD90 und negativ für CD34, CD11b, CD19, CD45 und HLA-DR waren. Analog hierzu zeigen Abb 1C und 1D die Untersuchung auf die Marker CD105 (mittels Fluorochrom PerCP-Cy5-5) und CD 73 (APC).

Zur Überprüfung der konstanten Expression dieser Oberflächenmarker wurde eine sechstägige Zellkultur mit täglichen Zellpassagierungen unter Standardbedingungen durchgeführt. Am Endpunkt nach sechs Tagen und fünf Zellpassagen (P5), wurde eine erneute Durchflusszytometrie durchgeführt (Abb. 7). Die Oberflächenmarker CD90, CD73, CD105 und CD44 zeigten hier eine stabile Expression.

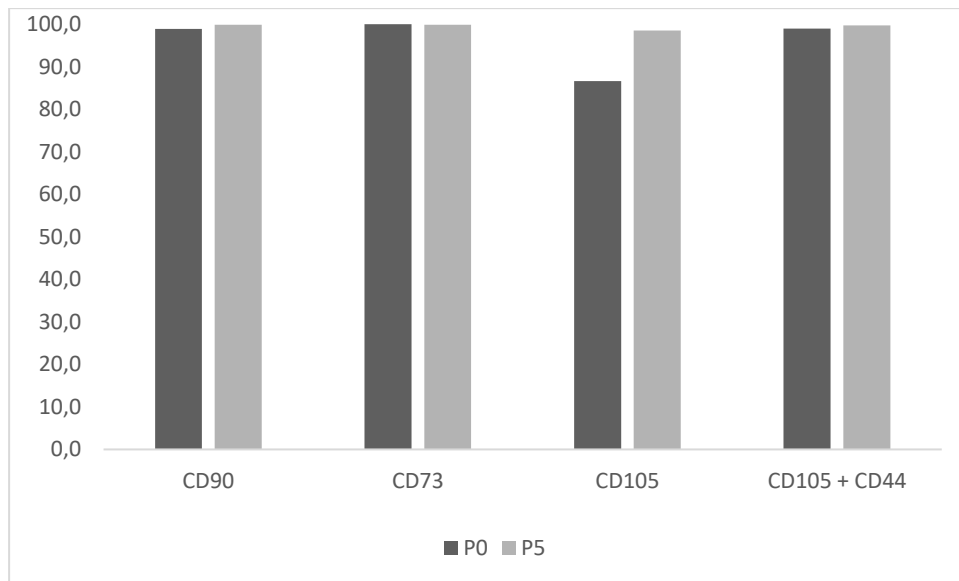


Abbildung 7: Vergleich der mesenchymalen Oberflächenmarker. Untersucht wurden CD90, CD73, CD105 und CD105+CD44 nach eintägiger Zellkultur ohne Passagierung (P0) und sechstägiger Zellkultur mit insgesamt fünf Zellpassagierungen (P5). Auf der Y-Achse ist der prozentuale Anteil der Zellen abgebildet, die das jeweilige Oberflächenmolekül trugen. Auf der X-Achse sind die zwei Versuchsgruppen P0 und P5 gegenübergestellt.

4.2 HDAC-Aktivitätsversuch

Dieser Versuch sollte die inhibitorische Wirkung von LBH589, MS-275 und MGCD0103 auf die Histondeacetylasen der verwendeten Stammzelllinie nachweisen. Grundlage dieses Assays ist das fluoreszierende Peptid Boc-Lys(Ac)-AMC als HDAC-Substrat. Eine Deacetylierung dieses Substrates führte zum Aussenden von Fluoreszenzsignalen. Zunächst wurde eine Vorversuchsreihe durchgeführt, um die benötigten Parameter für den Versuch festzulegen. Ziel war es, in den Vorversuchen möglichst hohe

Fluoreszenzsignale zu erhalten, damit eine spätere HDAC-Inhibition differenziert betrachtet werden konnte.

4.2.1 Auswahl eines geeigneten Lysepuffers

Der Lysepuffer diente der schonenden Extraktion der HDAC-Enzyme aus den Zellen, die zuvor in der Zellkultur mit den jeweiligen inhibitorischen Substanzen behandelt wurden.

Zur Auswahl eines geeigneten Lysepuffers wurden vier verschiedene, in unserem Labor bereits eingesetzte, Substanzen verglichen (Tabelle 10). Auswahlkriterien waren sowohl die jeweils nach Lyse der Zellen erhaltene Proteinmenge sowie die Stärke des Fluoreszenzsignals nach Zugabe des Substrates.

Lysepuffer	Proteinmenge (mg/ml)
RIPA	2,998
Era Lysispuffer	1,984
NP-40	2,769
Enzymlysepuffer	1,609

Tabelle 10: Aus Zelllysaten erhaltene Proteinmenge in Abhängigkeit vom Lysepuffer. NP40 Puffer nach abcam, RIPA -Puffer, Era-Lysepuffer und einem Enzymlysepuffer.

Die Stammzelllyse mittels RIPA-Puffer und NP-40 erbrachte die höchste Proteinmenge; 2,998 mg/ml bzw. 2,769 mg/ml (Tab. 10). Hier zeigten sich die beiden anderen Substanzen mit geringerer Proteinisolation unterlegen.

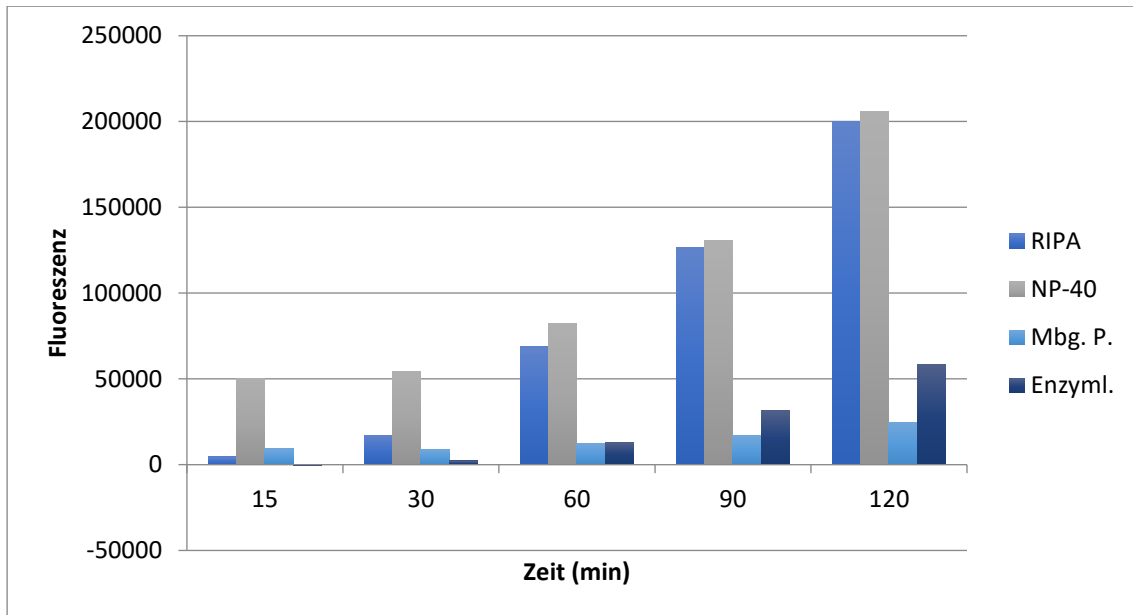


Abbildung 8: Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von verschiedenen Lysepuffersystemen. Nach eintägiger Zellkultur erfolgte die Lyse der Zellen und die Proteinisolierung mit den jeweiligen Puffersystemen RIPA, NP-40, Era Lysispuffer (Mbg. P.) Enzymlysispuffer. Anschließend erfolgte die Zugabe des fluoreszierenden Substrates Boc-Lys(Ac)-AMC und Trypsin. Nach Deacetylierung des Substrates durch die isolierten HDAC-Proteine konnte eine Spaltung des Substrates durch Trypsin erfolgen und ein Fluoreszenzsignal entstehen. Auf der X-Achse sind die Zeitpunkte abgebildet, nach denen jeweils das Fluoreszenzsignal des Probenansatzes gemessen wurde. RIPA = Radioimmunoprecipitation assay buffer n. abcam, NP-40 = NP40 Puffer nach abcam, Mbg. P. = Era Lysispuffer, Enzyml = Enzymlysispuffer.

Die weitere Verwendung der mit den vier Puffern isolierten HDACs zeigte eine höhere Fluoreszenzsignalstärke im Versuchsaufbau mit dem RIPA- und dem NP-40 Puffer. Dies sprach dafür, dass die Proteinisolierung mittels dieser Puffer eine größere Anzahl von HDAC-Enzymen extrahierte. Gesucht waren hohe Fluoreszenzintensitäten, damit im weiteren Verlauf Fluoreszenzabnahmen infolge von HDAC-Inhibition besser differenziert werden konnten.

Da der NP-40 Puffer bereits im Labor etabliert war, wurden alle weiteren Versuchsreihen mit dieser Substanz fortgeführt.

4.2.2 Festlegung einer geeigneten Proteinmenge

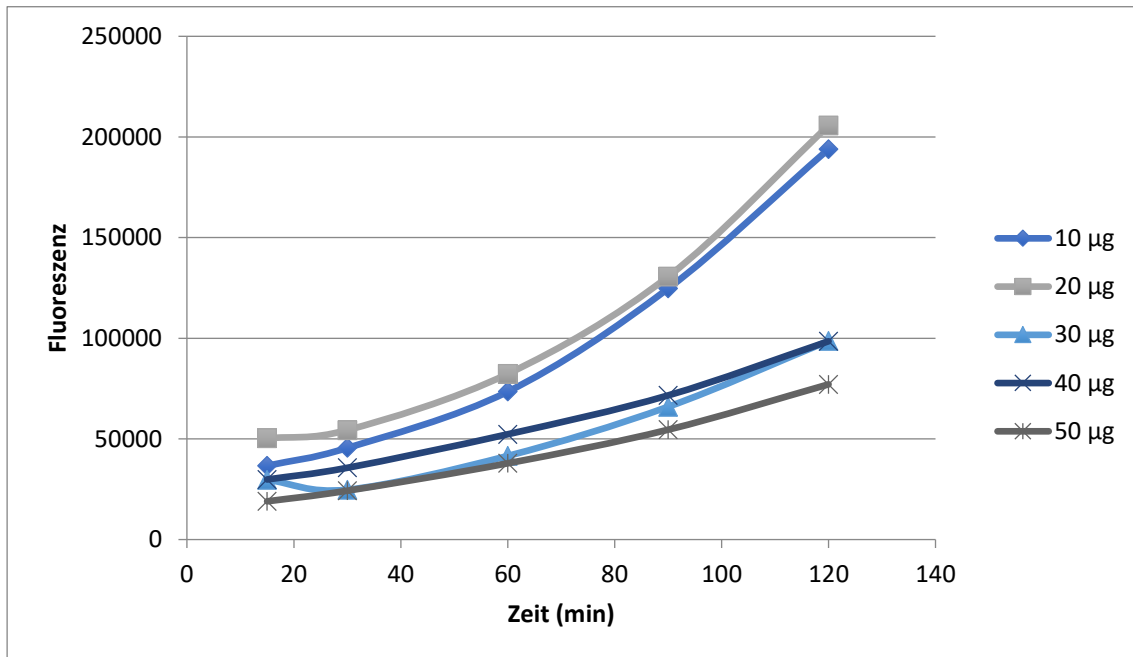


Abbildung 9: Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Proteinmenge. Versuchsaufbau siehe Abb. 8.

Zur Bestimmung einer optimalen Proteinmenge als Enzymangebot für einen geeigneten Substratumsatz im Hauptversuch wurden die Mengen von 10 µg bis 50 µg getestet (Abb. 9). Das stärkste Signal zeigte sich bei 20 µg Zellprotein, sodass diese Menge für alle weiteren Versuchsreihen festgelegt wurde. Zunehmende Proteinkonzentrationen führten zu einer Abnahme des Fluoreszenzsignals.

4.2.3 Festlegung einer geeigneten Boc-Lys(Ac)-AMC Substratmenge

Boc-Lys(Ac)-AMC ist ein Substrat, welches nach Deacetylierung durch die HDACs und anschließender Abspaltung eines Restes durch Trypsin, Licht emittiert.

Getestet wurden Substratmengen von 100 µM bis 300 µM. Die höchsten Fluoreszenzintensitäten wurden unter 200 µM und 300 µM gemessen (Abb. 10). Unter diesen Konzentrationen zeigten sich jedoch auch hohe Spontanzerfallsraten (Abb. 11), sodass die Wahl der weiteren Substratkonzentration auf 150 µM fiel, bei niedrigerer Spontanzerfallsrate und hoher Fluoreszenzintensität.

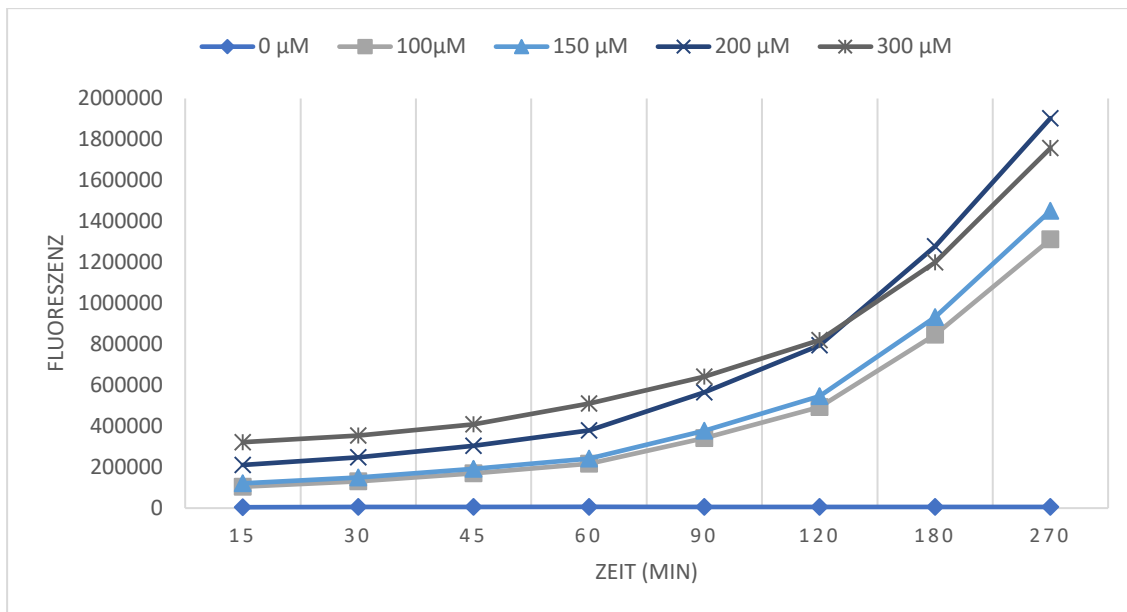


Abbildung 10: Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von unterschiedlichen Substratkonzentrationen. Versuchsaufbau siehe Abb. 8.

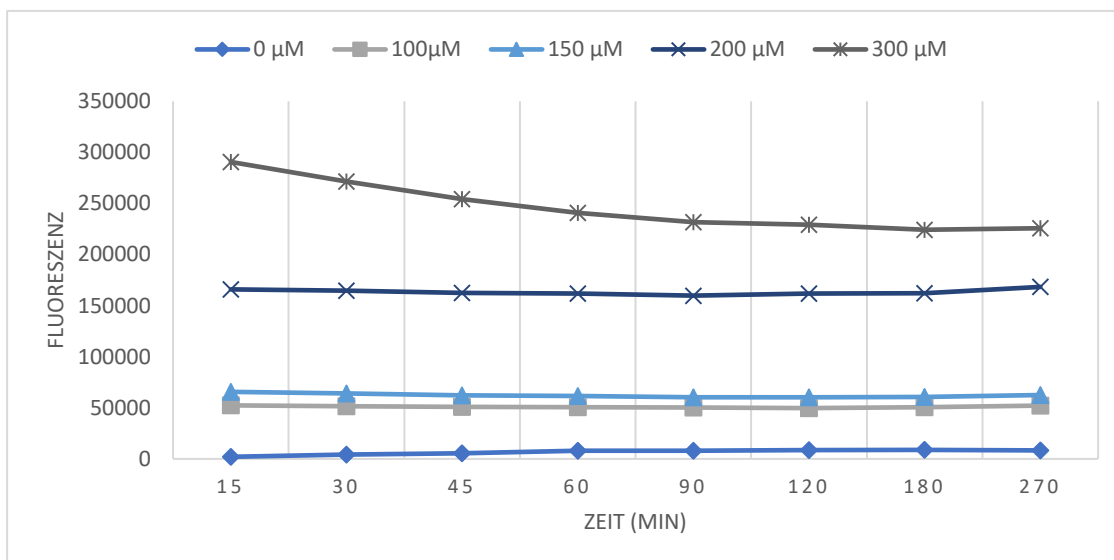


Abbildung 11: Fluoreszenz aufgrund des Spontanzerfalls bei unterschiedlichen Substratkonzentrationen. Versuchsaufbau siehe Abb. 8.

4.3 Hauptversuchsreihen

Der Histondeacetylase-Assay diente der Überprüfung, ob die verwendeten HDACi LBH589, MS-275 und MGCD0103 eine inhibitorische Wirkung auf die HDACs der humanen mesenchymalen Knochenmarksstammzellen hatten.

Die hMSC-TERT Zellreihe wurde über insgesamt 20 Tage mit den jeweiligen HDACi in unterschiedlichen Konzentrationen behandelt. Die Zelllysate mit den zelleigenen HDACs wurden dann auf ihre Enzymaktivität überprüft. Als Positivkontrolle dienten unbehandelte Zelllysate (HDAC-Inhibitorkonzentration 0 nM), also die Probe mit der am höchsten zu erwartenden Fluoreszenzintensität und somit der höchsten Aktivität der HDACs. Eine Abnahme in der Fluoreszenzintensität entstand durch eine verminderte HDAC-Aktivität aufgrund zunehmender Konzentrationen der HDACi.

4.3.1 LBH589

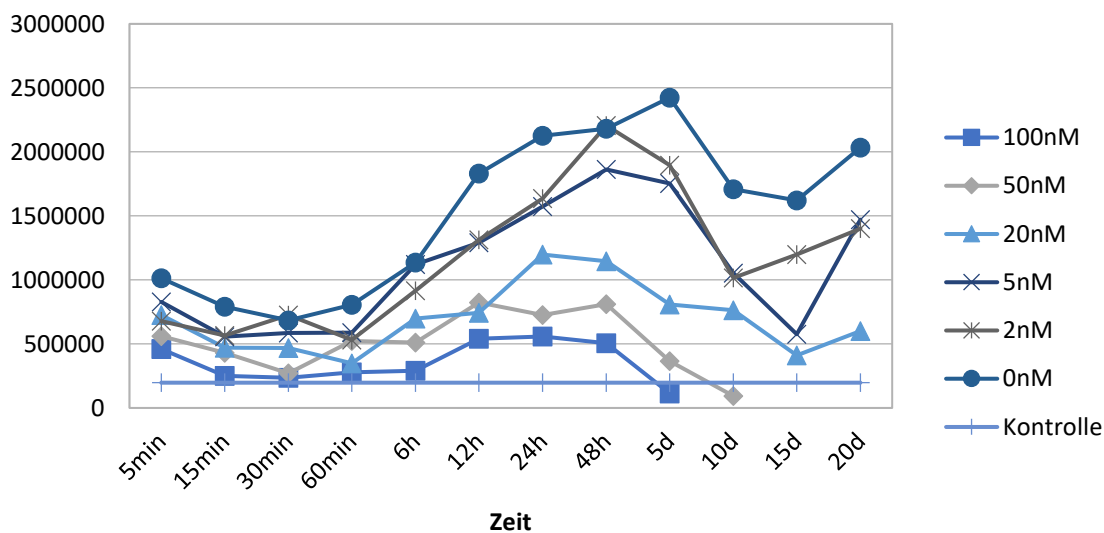


Abbildung 12: Zeitabhängige inhibitorische Wirkung von LBH589. Untersucht wurden unterschiedliche Konzentrationen von LBH589 in ihrer Wirkung auf die HDACs der hMSC-TERT. Es wurde eine Zellkultur über insgesamt 20 Tage durchgeführt. Täglich erfolgte ein Mediumwechsel mit erneuter Zugabe des HDACi in der angegebenen nanomolaren Konzentration. Als Positivkontrolle dienten unbehandelte Zellen (0nM), die die höchste Fluoreszenzintensität zu erwarten hatten. Als Negativkontrolle (Kontrolle) dienten Zellen, die nachträglich außerhalb der Zellkultur mit einem Breitspektrum-inhibitor (LBH589) in hoher Dosis (3 mM) inhibiert wurden. Initial erfolgte die Aussaat von 5×10^5 Zellen pro Zellkulturschale. Auf der X-Achse sind die Zeitpunkte abgebildet, zu denen jeweils die Zellkultur abgebrochen wurde um anschließend die HDAC Aktivität zu überprüfen. Die Y-Achse stellt hierzu die jeweilige Fluoreszenzintensität dar. min = Minute, h = Stunde, d = Tag.

Um die optimale inhibitorische Konzentration des Breitspektrum-inhibitors LBH589 auf die MSC zu ermitteln, wurden, orientiert an IC₅₀-Werten aus der Literatur, Inhibitor-konzentrationen von zwei nanomolar bis 100 nanomolar verwendet (Scuto et al. 2008).

Anhand der Abbildung 12 lässt sich eine abgestufte Fluoreszenzabnahme entlang des Konzentrationsanstiegs des Inhibitors LBH589 erkennen. Nach sechs Stunden trennten sich die anfänglich noch nahe beieinanderliegenden Kurven auf. Während es bei der Positivkontrolle (0 nM) sowie den niedrigen Inhibitor-konzentrationen (2 nM und 5 nM) zu einem stetigen Emissionsanstieg kam, zeigte die Kurve der 20 nanomolaren Konzentrationen einen nahezu konstanten Verlauf. Ein fortwährender Emissionsanstieg > 12 Stunden war an ein fortschreitendes Zellwachstum in der Zellkultur gekoppelt.

Als Negativkontrolle dienten Zelllysate, die im Nachhinein durch die Gabe eines Breitspektrum-inhibitors in hoher Konzentration ihre HDAC-Aktivität vollständig verloren. Im Zellkulturversuch zeigten die hohen LBH589-Konzentrationen (50 nM und 100 nM) einen sich an diese Negativkontrolle annähernden Verlauf. Das morphologische Korrelat in der Zellkultur war durch massiven Zelluntergang gekennzeichnet, mit dem Ergebnis eines vollständigen Absterbens der Zellen nach zwei bis sechs Tagen.

Die abnehmenden Fluoreszenzintensitäten zwischen fünf und zehn Tagen kamen durch ein Absterben der Zellen aufgrund des Platzmangels in der Zellkulturschale zustande. Der erneute Anstieg war durch die Proliferation der überlebenden Zellen zu erklären. Dies ließ sich anhand der Positivkontrolle (0 nM) darstellen. Bei einer initialen Zellaussaat von 1×10^5 Zellen zeigte sich schon nach fünf Tagen eine Konfluenz von 100% in der Zellkulturschale, die sich im weiteren Verlauf durch ein Ablösen und Absterben der Zellen kennzeichnete. Aufgrund dieser technischen Gegebenheit wurde der Endpunkt aller weiteren Versuchsreihen auf fünf Tage festgelegt.

Das konstanteste Wachstumsverhalten innerhalb dieser Versuchsreihen zeigten die Zellen unter einer Konzentration von 20 nM. Eine signifikante Fluoreszenzabnahme trat hier schon nach sechs Stunden auf und wurde im weiteren Verlauf bis zum Endpunkt nach fünf Tagen aufrechterhalten (Abb. 13).

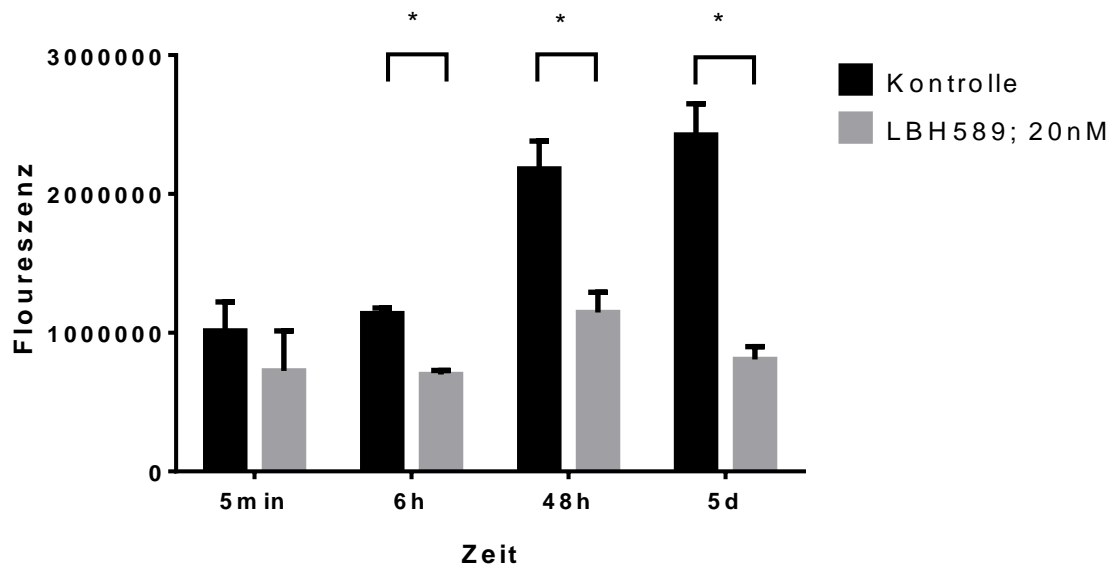


Abbildung 13: Zeitabhängige Unterschiede in der Fluoreszenzintensität zwischen einer 20 nM LBH589 Konzentration und der 0 nM-Kontrolle.

Nach ca. 24 h Stunden kam es zu einer Stagnation des Wachstums und zur morphologischen Änderung der Zellen (Abb. 14 B). Proliferation und Apoptose hielten sich die Waage.

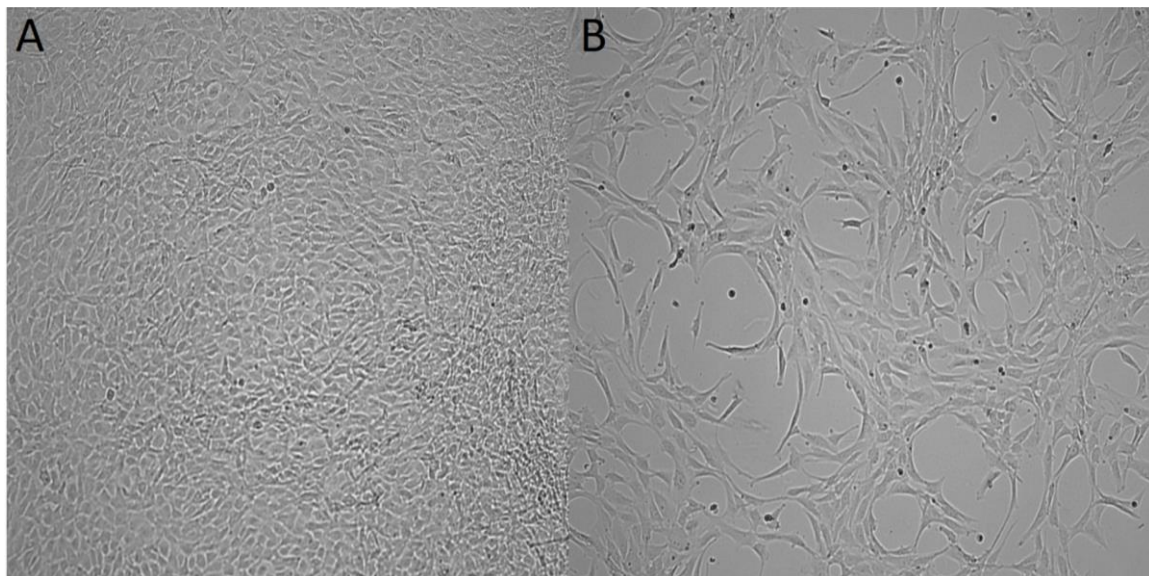


Abbildung 14: Zellmorphologie unter LBH589. Vergleich der Zellmorphologie nach fünf Tagen Zellkultur ohne Inhibitorbehandlung (A) und unter einer LBH589 Konzentration von 20 nM (B). Aufnahme mit Juli Br. Live cell movie analyzer (Nano Entek).

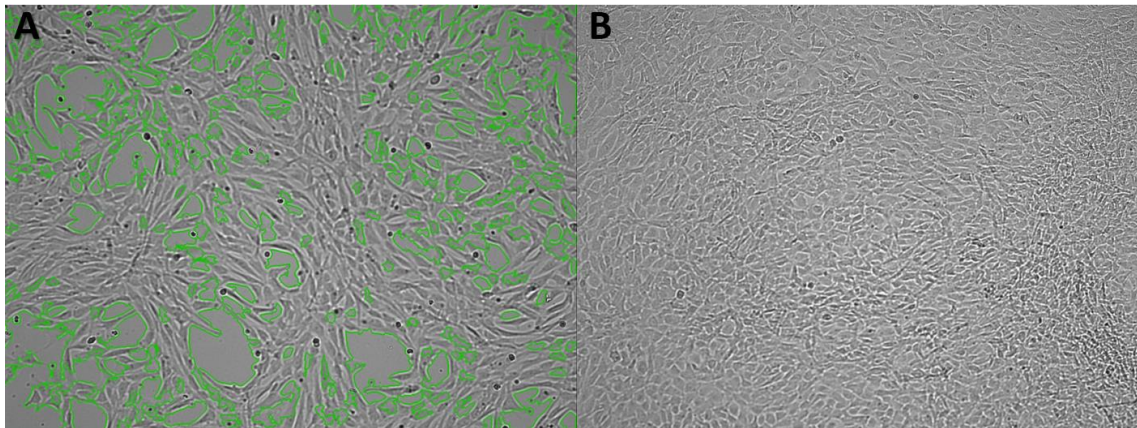


Abbildung 15 : Zellkonfluenzmessung unter LBH589 A: Zellkonfluenzmessung nach fünftägiger Zellkultur unter Behandlung mit LBH589. Es zeigte sich eine Zellkonfluenz von 74,19%. Grün umrandet sind die freien Räume zwischen den einzelnen Zellen. Es erfolgte eine initiale Zellzahlaussaat von 5×10^5 Zellen. B: Im Vergleich dazu eine Kontrollzellkultur ohne Inhibitorbehandlung. Hier zeigte sich nach fünftägiger Zellkultur eine Konfluenz von 100%, es waren keine grün umrandeten Felder mehr darstellbar. Hier erfolgte eine initiale Zellaussaat von 1×10^5 . Die Konfluenzmessungen wurden mit dem Juli Br. Live cell movie analyzer (Nano Entek) durchgeführt.

4.3.2 MS-275

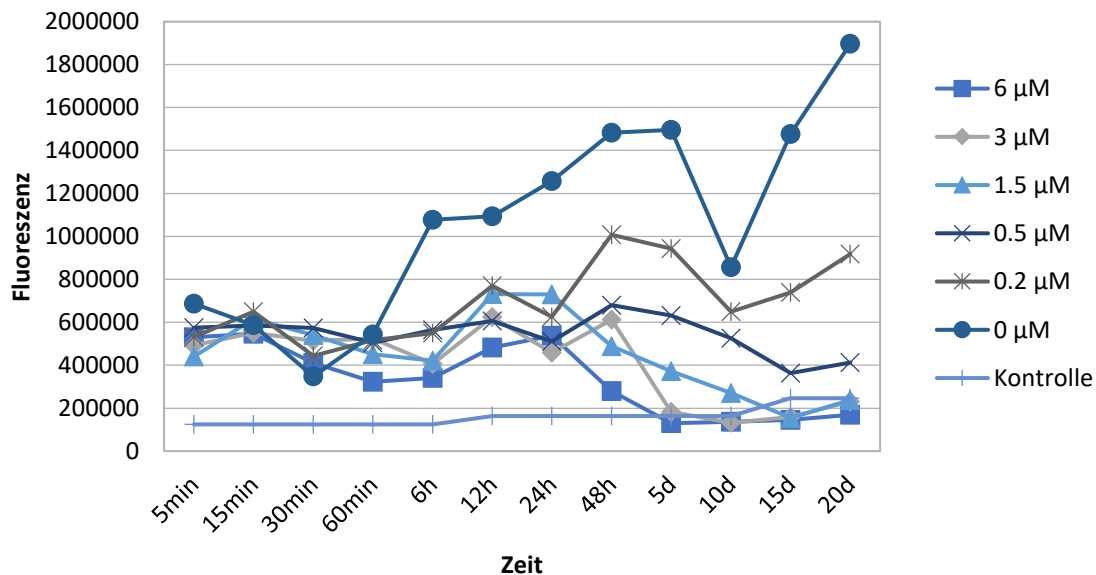


Abbildung 16: Zeitabhängige inhibitorische Wirkung von MS-275. Untersucht wurden unterschiedliche Konzentrationen von MS-275 in ihrer Wirkung auf die HDACs der hMSC-TERT.

Analog zum Versuchsaufbau des HDAC-Assays mit LBH589 führten wir die Versuchsreihen ebenfalls mit dem Klasse-I-spezifischen HDACi MS-275 durch. Ebenfalls orientiert an den in der Literatur verwendeten Konzentrationen erfolgte die Überprüfung der Enzyminhibition im micromolaren Bereich. (Rosato et al. 2003; Saito et al. 1999). Hier zeigte sich ein ähnlicher Kurvenverlauf mit ähnlichem Wachstumsverhalten der Zellen unter den jeweiligen Inhibitorkonzentrationen. Das stabilste Zellwachstum zwischen überschießender Proliferation und Zelluntergang zeigten die Stammzellen unter einer inhibitorischen Konzentration von 1,5 μM MS-275 (Abb. 16). Eine signifikante Fluoreszenzabnahme trat hier jedoch erst nach 48 Stunden im Vergleich zur Kontrolle auf (Abb. 17). Konzentrationen von 3 μM und 6 μM führten schon nach 24 Stunden zum Absterben der Zellkultur. Unter 0,5 und 0,2 micromolarer Behandlung zeigte sich ein Zellwachstum mit starker Proliferation, sodass es hier, wie auch bei den 0 nM-Kontrollzellen, zu einem Zelluntergang nach fünf Tagen aufgrund von Platz- und Nährstoffmangel in der Zellkulturschale kam.

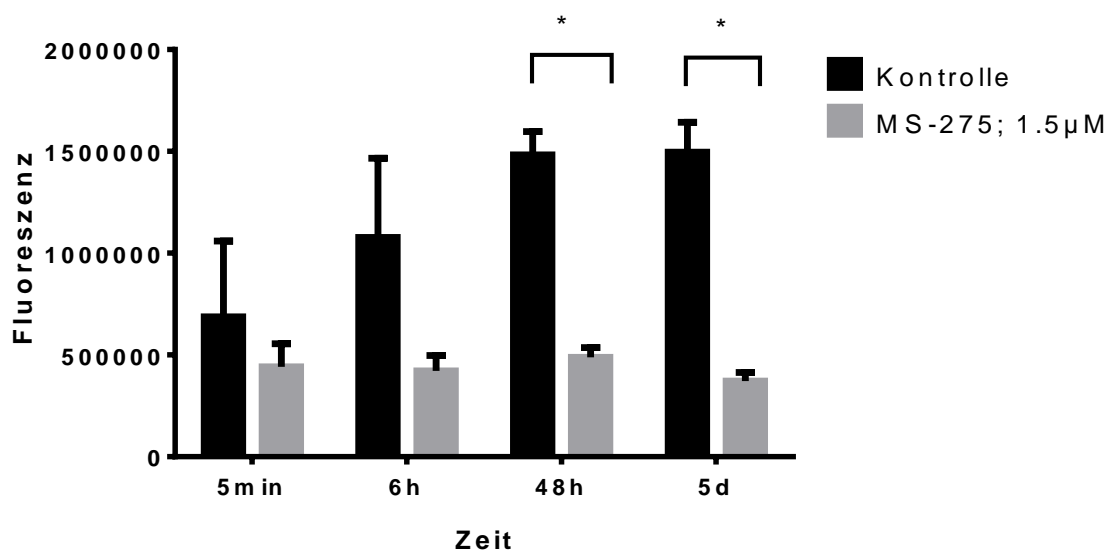


Abbildung 17: Zeitabhängige Unterschiede in der Fluoreszenzintensität zwischen einer 1,5 μM MS-275 Konzentration und der 0 nM-Kontrolle.

4.3.3 MGCD0103

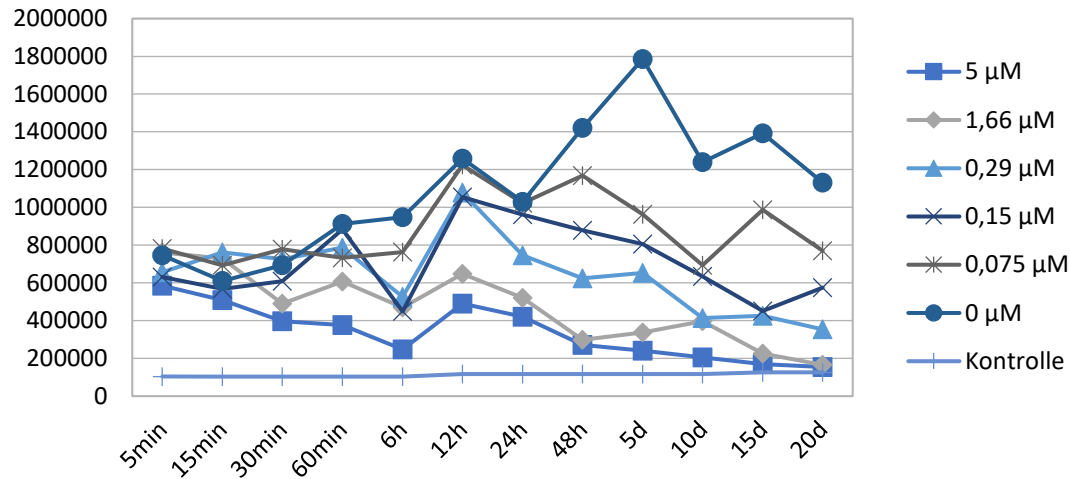


Abbildung 18: Zeitabhängige inhibitorische Wirkung von MGCD0103. Untersucht wurden verschiedene Konzentrationen in ihrer Wirkung auf die HDACs der hMSC-TERT.

Orientiert an Werten aus der Literatur, wurden abgestuft die Konzentrationen von fünf micromolar bis 0,075 micromolar überprüft (Fournel et al. 2008).

Auch auf die mesenchymalen Stammzellen zeigte MGCD0103 im micromolaren Konzentrationsbereich eine HDAC-inhibitorische Wirkung mit Fluoreszenzminderungen über 20 Tage im HDAC Assay. Konzentrationsabhängig abgestuft zeigt sich auch hier ähnliches Wachstumsverhalten der Zellen in der Zellkultur. Unter einer 1,66-micromolaren Behandlung kam es nach sechs Stunden zu einer signifikanten Fluoreszenzminderung im Vergleich zur 0 nM-Kontrolle. Bei dieser Konzentration zeigte sich nach fünftägiger Zellkultur ein deutlich geändertes Wachstumsverhalten der Zellen. Es kam zu einem Proliferationsstopp und zur clusterartigen Anordnung der Zellen (Abb. 19 B).

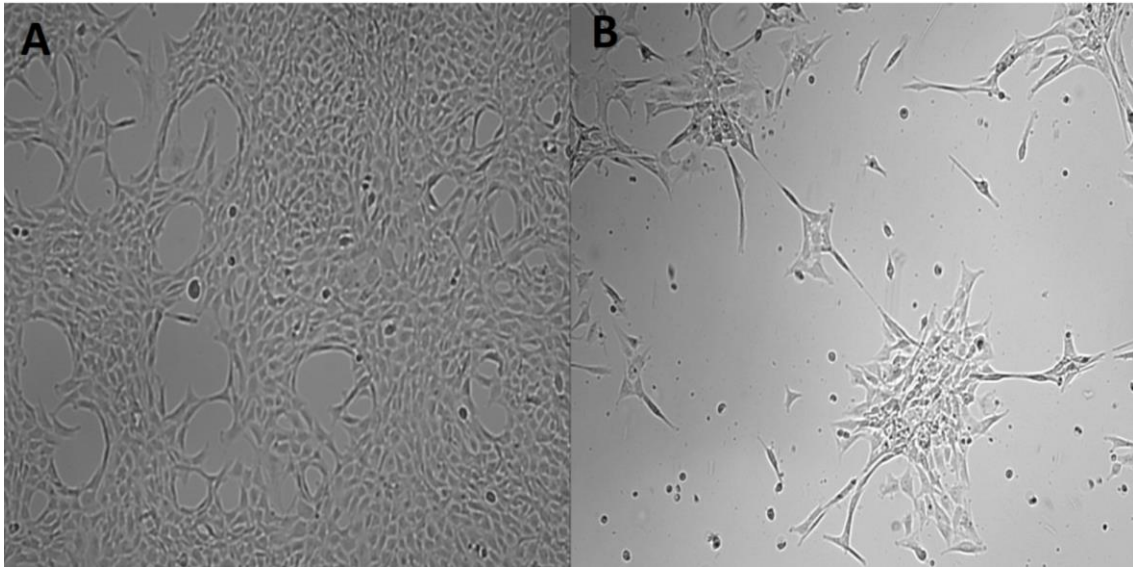


Abbildung 19: Vergleich der Zellmorphologie unter MGCD0103. Verglichen wurde die Zellmorphologie nach fünf Tagen Zellkultur ohne Inhibitorbehandlung (A) und unter einer MGCD0103 Konzentration von 1,66 μM (B). Aufnahme mit Juli Br. Live cell movie analyzer (Nano Entek).

Insgesamt zeigten sowohl der Breitspektrum-inhibitor LBH589, als auch die Klasse-I-spezifischen Inhibitoren MS-275 und MGCD0103 eine HDAC inhibitorische Wirkung gekennzeichnet durch Fluoreszenzabnahme im HDAC-Assay und Proliferationsstopp in der Zellkultur. Im Weiteren sollte untersucht werden, ob die Zellbehandlung mit 20 nM LBH589, 1,5 μM MS-275 und 1,66 μM MGCD0103 auch Einfluss auf die Expression bestimmter Transkriptionsfaktoren hatte, die eine Rolle bei der endokrin pankreatischen Zellentwicklung spielen.

4.4 Genexpression differenzierungsrelevanter Transkriptionsfaktoren unter dem Einfluss der HDACi

Die Genexpressionsanalyse mittels real-time PCR erfolgte mittels der $\Delta\Delta\text{CT}$ Methode. Hierzu ist es zwingend notwendig, zunächst ein stabiles, nicht reguliertes und konstitutiv exprimiertes Haushaltsgen (house keeping gene, HKG) für die verwendete Zelllinie zu finden (Ragni et al. 2013).

Geläufige HKG wurden getestet: ACTB, B2M, GAPD, GUSB, HPRTI, PGK, PP1A, RPL13A, TBP, TFRC, YWHAZ #1, YWHAZ #2. Die Güte des HKG wurde anhand des Varianzkoeffizienten und des CT-Wertes unter der Behandlung mit LBH589 bestimmt.

<u>HKG</u>	<u>Mittlerer CT-Wert</u>	<u>Vark(x)%</u>	<u>Rang</u>
RPL13A	17,81	1,76	<u>1</u>
ACTB	18,44	3,45	<u>2</u>
YWHAZ #1	19,1	5,69	<u>3</u>
YWHAZ #2	16,61	5,82	<u>4</u>
GUSB	27,67	0,81	5
TBP	35,62	1,75	6
PGK	24,9	1,98	7
GAPD	22,58	2,89	8
HPRT1	27,15	2,13	9
TFRC	27,64	4,2	10
B2M	14,33	8,62	11
PP1A	10,83	23,45	12

Tabelle 11: Ranking der HKGs. Sortiert nach dem mittleren CT-Wert. CT = cycle treshold

Der optimale CT-Wert (= cycle treshold), also der Wert, an dem das Gen zum ersten Mal während der real-time PCR messbar war, sollte zwischen 15 und 20 liegen. Den niedrigsten CT-Mittelwert über alle Versuchsreihen zeigte das Ribosomale Protein L13a (RPL13A) mit $CT_{\text{mean}}=17,81$, gefolgt von ACTB und YWHAZ #1 (Tab. 11).

<u>HKG</u>	<u>Mittlerer CT-Wert</u>	<u>Vark(x)%</u>	<u>Rang</u>
GUSB	27,67	0,81	1
TBP	35,62	1,75	2
RPL13A	17,81	1,76	3
PGK	24,9	1,98	4
HPRT1	27,15	2,13	5
GAPD	22,58	2,89	6
ACTB	18,44	3,45	7
TFRC	27,64	4,2	8
YWHAZ #1	19,1	5,69	9
YWHAZ #2	16,61	5,82	10

B2M	14,33	8,62	11
PP1A	10,83	23,45	12

Tabelle 12: Ranking der HKGs. Sortiert anhand des Varianzkoeffizienten

Den niedrigsten Varianzkoeffizienten innerhalb der fünftägigen Behandlungsphase zeigte GUSB mit 0,81% gefolgt von TBP (1,75%) und RPL13A mit 1,76% (Tab. 12). Je niedriger der Varianzkoeffizient, desto stabiler war die Genexpression über die fünftägige Behandlung mit LBH589.

Die Wahl eines geeigneten HKG erfolgte durch Kombination dieser beiden Güteparameter. Hier zeigte sich RPL13A mit niedrigem CT-Wert und Varianzkoeffizienten den anderen HKG innerhalb dieser Versuchskonstellation überlegen.

Auch die weiteren Versuchsreihen mit den Klasse-I-spezifischen HDACi bestätigten dieses Ergebnis.

4.4.1 Polymerase- Kettenreaktion und Agarose-Gelelektrophorese zur qualitativen Primerkontrolle

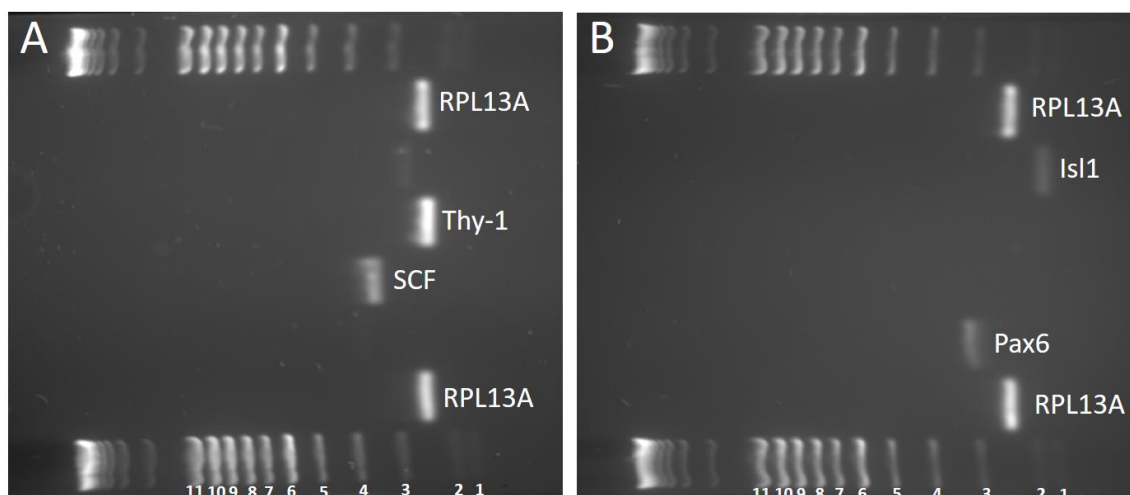


Abbildung 20: Agarose-Gelelektrophorese der PCR Produkte. A: Stammzellmarker *Thy-1* (112 bp) und *SCF* (222 bp). B: Transkriptionsfaktoren *ISL-1* (75 bp) und *Pax6* (187 bp). Housekeeping gene: *RPL13A* (126 bp Produktgröße). DNA Leiter: 1 = 80 bp, 2 = 100 bp, 3 = 200 bp, 4 = 300 bp, 5 = 400 bp, 6 = 500 bp, 7 = 600 bp, 8 = 700 bp, 9 = 800 bp, 10 = 900 bp, 11 = 1031 bp. bp= Basenpaare.

Zur Überprüfung der gewünschten Sequenz der verwendeten Primer wurde eine Polymerase Kettenreaktion durchgeführt. Die entstandenen Amplifikate wurden auf einem 1,75% Agarose Gel aufgetrennt (Abb. 20 A, B). Hier bestätigten sich die zuvor mittels Primerblast bei Primer3.de und pubmed.com berechneten Produktgrößen der, durch die Primer festgelegten Gensequenzen: RPL13A = 126 Basenpaare (bp), SCF = 222 bp, Thy-1 = 112 bp, ISL-1 = 75bp, Pax = 187 bp. Somit durfte angenommen werden, dass die in der real-time PCR verwendeten Primer auch die gewünschten Gensequenzen der untersuchten Gene gebunden haben, damit diese amplifiziert und detektiert werden konnten: RPL13A (fw = cctggaggagaagaggaaagaga, rev = ttgaggacctctgtgtattgtcaa), Thy-1 (fw= atgaaggtcctctacttatccgc, rev = gcactgtgacgttctggga), SCF (fw = ggtggcaaatcttcaaaa, rev = tctttcacgcactccacaag), ISL-1 (fw = atgaaggtcctctacttatccgc caactggcaaatcttcaaaa, rev = ttgagaggacattgatgctacttcac), Pax6 (fw = ttgcagcctacattccctga, rev = gggctctcaaagtctctgct).

4.4.2 Quantitative real-time PCR zur Messung der Veränderung der Genexpression unter dem Einfluss der HDACi

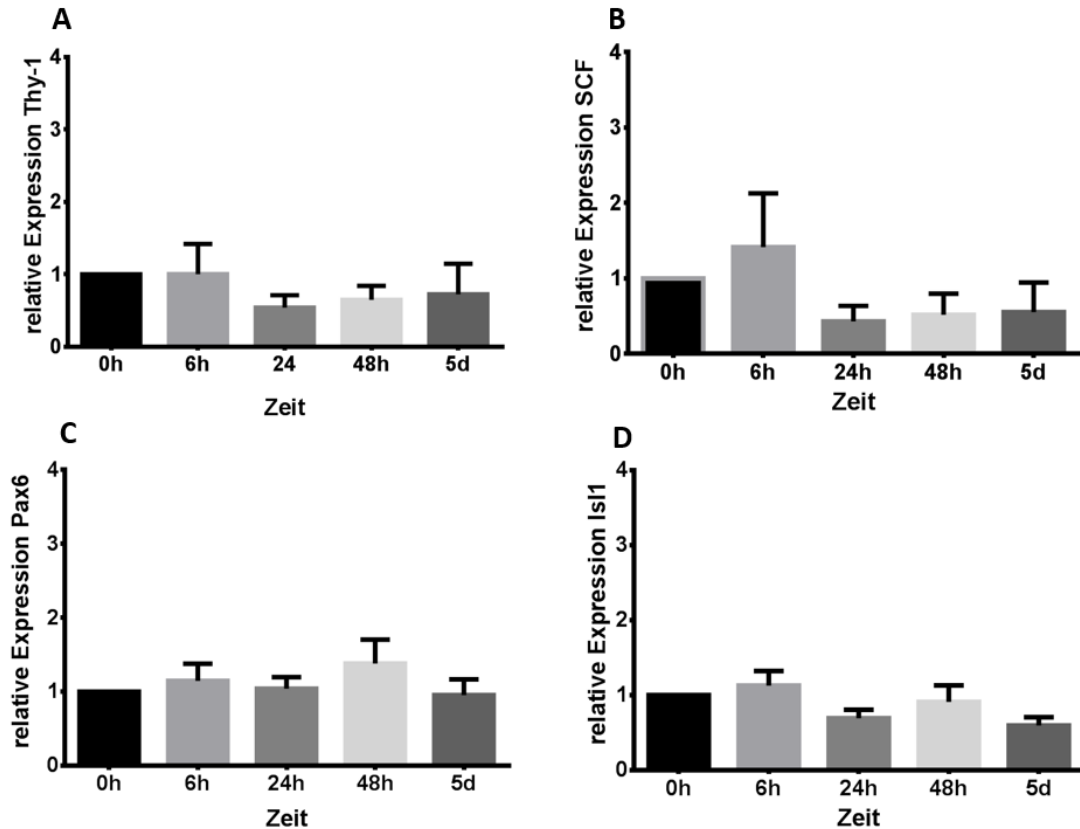


Abbildung 21: Genexpressionsanalyse von Kontrollzellen. Messung der Genexpression der Stammzellmarker Thy-1 (A) und SCF(B), sowie der Transkriptionsfaktoren Pax6 (C) und ISL-1 (D) mittels real-time PCR unter Kontrollbedingungen. Es erfolgte eine fünftägige Zellkultur ohne die Behandlung durch einen HDACi, nur unter Zugabe des Lösungsmittels DMSO zu späteren Zeitpunkten (6 h, 24 h, 48 h, 5 d). Der Zellmediumwechsel wurde täglich durchgeführt. Direkt zu Beginn der Zellkultur (0 h) und zu den festgelegten Zeitpunkten sechs, 24, 48 und 120 Stunden erfolgte die Lyse der Zellen mit nachfolgender RNA-Isolation und cDNA Herstellung. Jede Messung wurde sechsfach durchgeführt.

Um die Wirkung der HDACi LBH589, MS-275, MGCD0103 auf Genebene zu untersuchen, wurde eine quantitative real-time PCR durchgeführt. Die Genexpression von Thy-1, SCF, Pax6 und ISL-1 wurde zu definierten Zeitpunkten gemessen. Diese wurden zuvor anhand des HDAC-Assays bestimmt. Hier zeigte sich eine erste signifikante HDAC-inhibitorische Wirkung durch LBH589 und MGCD010 bereits nach sechs Stunden, unter MS-275 war diese erst nach 24 Stunden zu beobachten. Bei allen

drei HDACi hielt diese Wirkung bis nach fünf Tagen an. Als interner Kontrollpunkt dienten unbehandelte Zellen zum Zeitpunkt null Stunden.

Alle Messungen wurden sechsfach durchgeführt. Abbildung 21 zeigt zunächst die Genexpression der untersuchten Gene im zeitlichen Verlauf ohne die Zugabe von HDACi in der Zellkultur. Hier erfolgte lediglich nach sechs Stunden die Zugabe von DMSO. Die erfassten Gene zeigen sich hier stabil über den gesamten Zeitverlauf, ohne signifikante Veränderungen in ihrer Expression.

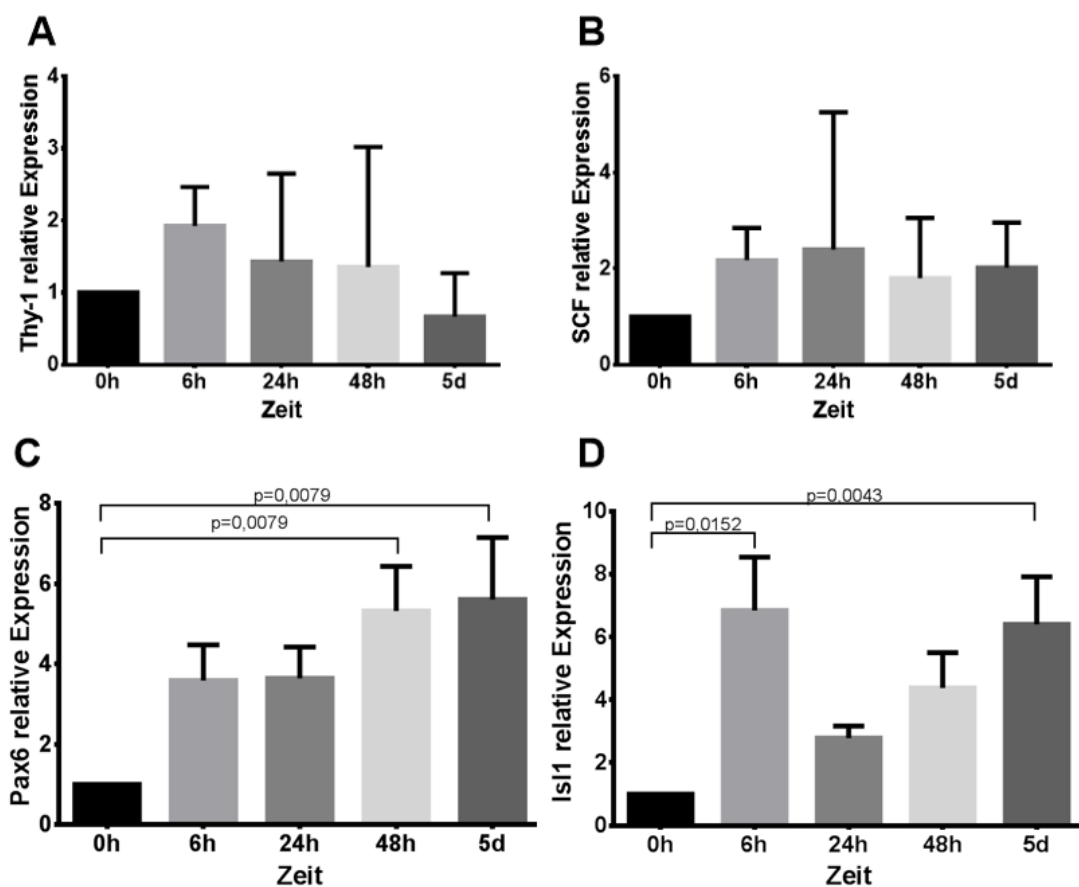


Abbildung 22: Genexpressionsanalyse LBH589-behandelter Zellen. Genexpression der Stammzellmarker Thy-1 (A) und SCF (B), sowie der Transkriptionsfaktoren Pax6 (C) und ISL-1 (D) im zeitlichen Verlauf unter der täglichen Behandlung mit dem Breitspektrum-inhibitor LBH589 in einer Konzentration von 20 nM. Versuchsaufbau siehe Abb 21.

Abbildung 22 zeigt die veränderte Genexpression der untersuchten Gene bei der täglichen Zugabe von 20nM LBH589 zum normalen Mediumwechsel in der Zellkultur.

Es stellte sich unter dem Einfluss des Breitspektrum-inhibitors LBH589 eine signifikante, fast sechsfach erhöhte Heraufregulation der Pax6 Expression nach 48 h und 5 d (Abb. 22 C) dar. Der Transkriptionsfaktor ISL-1 zeigte ein dynamisches Muster in seiner Expression unter LBH589. Nach einem frühen, signifikanten ($p < 0,05$) Expressionsanstieg nach sechs Stunden kam es zunächst zu einer Herunterregulation, die sich sukzessive zu einem neuen Anstieg der Expression bis zum Endpunkt nach fünf Tagen entwickelte (Abb. 22 D).

Die Expression des Oberflächenmoleküls Thy-1 fiel nach einem initialen Anstieg nach sechs Stunden im weiteren Verlauf tendenziell ab. Eine signifikante Veränderung war jedoch nicht zu beobachten. Auch der Stem cell factor (SCF) blieb während der Behandlung mit dem Breitspektrum-inhibitor nahezu konstant exprimiert.

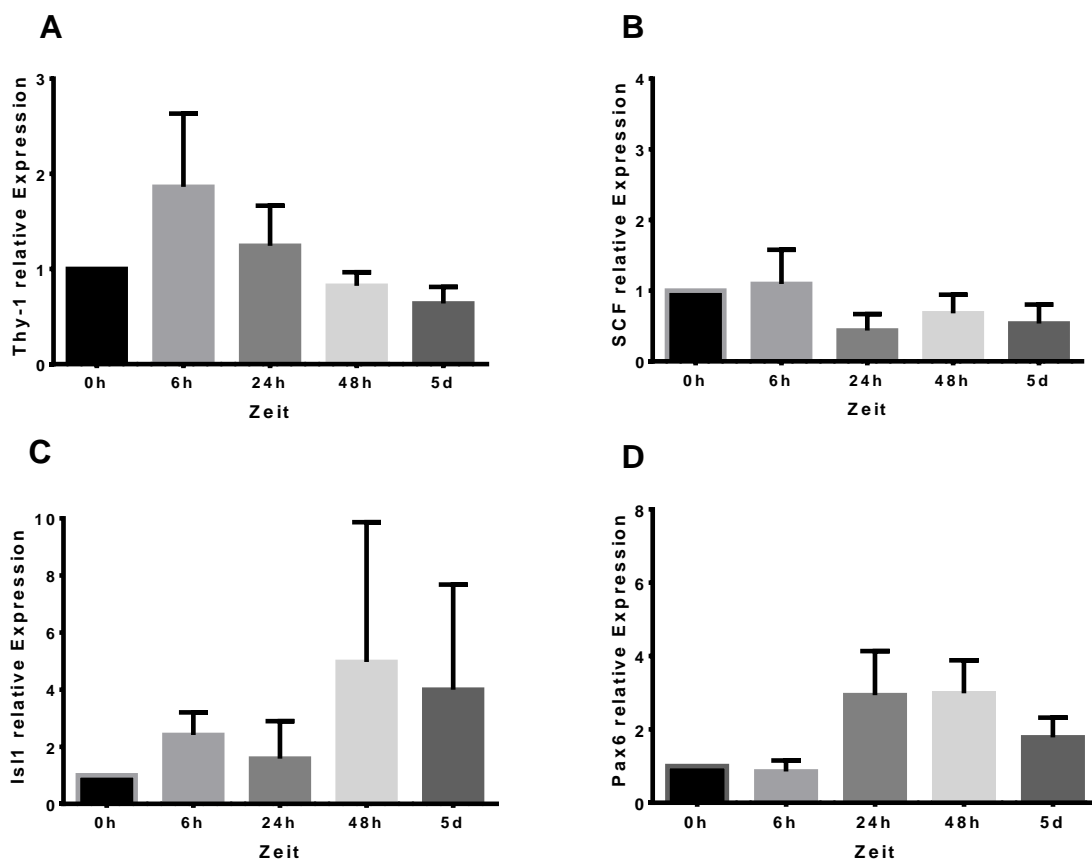


Abbildung 23: Genexpressionsanalyse MS-275-behandelter Zellen. Genexpression der Stammzellmarker Thy-1 (A) und SCF (B), sowie der Transkriptionsfaktoren Pax6 (C) und ISL-1 (D) im zeitlichen Verlauf unter der Behandlung mit 1,5 μ M MS-275.

Unter Behandlung mit dem Klasse-I-spezifischen HDACi MS-275 in einer Konzentration von 1,5 μM ließ sich bei der Expression des Oberflächenmarkers Thy-1 ebenfalls eine nicht signifikante Abnahme nach initialer Heraufregulation beobachten. Auch SCF zeigte sich hier im Wesentlichen stabil ohne signifikante Änderung. Im Gegensatz zu der Zellkultur mit LBH589 fand sich jedoch bei ISL-1 und Pax6 keine signifikante Veränderung in dem jeweiligen Expressionsmuster. Tendenziell lag jedoch eine erhöhte Expression des Pax6 Gens nach 24 h und 48 h vor (Abb. 23 A-D).

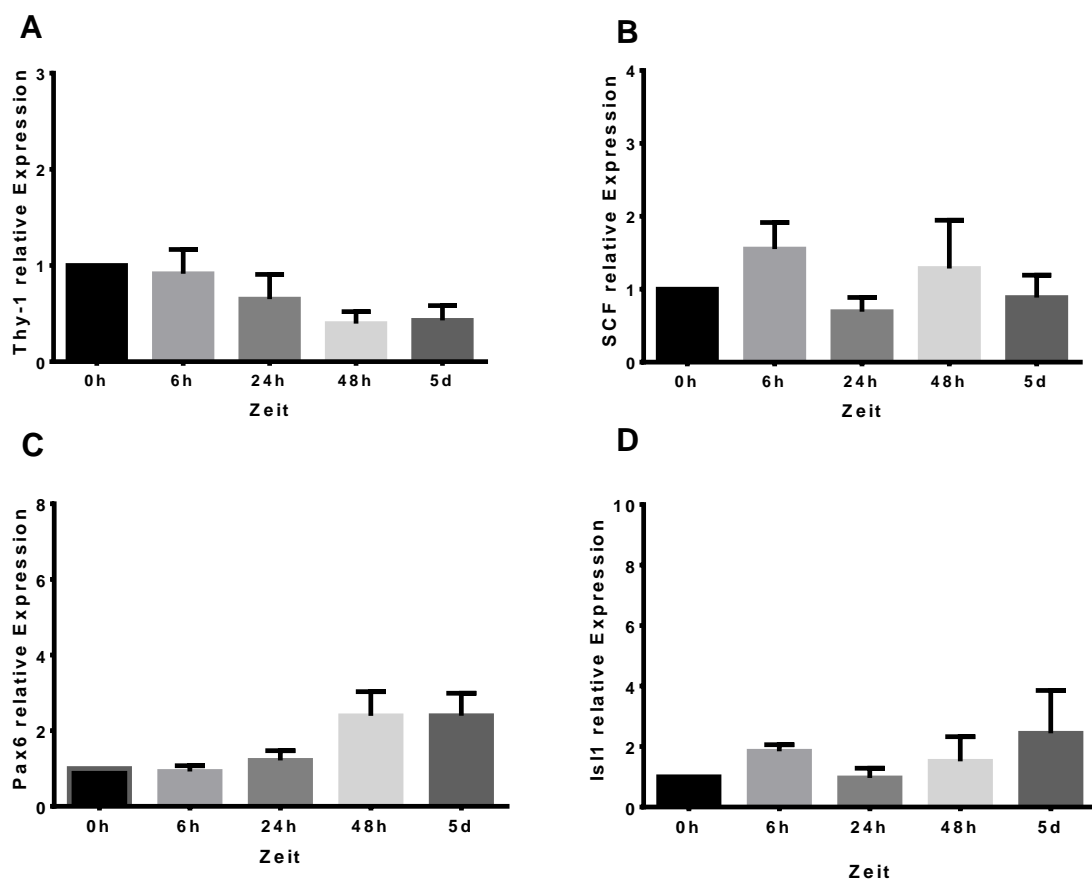


Abbildung 24: Genexpressionsanalyse MGCD0103 behandelter Zellen. Genexpression der Stammzellmarker Thy-1 (A) und SCF (B), sowie der Transkriptionsfaktoren Pax6 (C) und ISL-1 (D) im zeitlichen Verlauf unter der Behandlung mit MGCD0103, 1,66 μM .

Ähnlich zum vorangegangenen Klasse-I-spezifischen HDACi verhielten sich auch die Genexpressionsmuster der untersuchten Gene unter der Behandlung mit MGCD0103, 1,66 μM , über fünf Tage. Eine nicht signifikante Abnahme von Thy-1 wurde begleitet durch schwache, nicht signifikante Anstiege der Expression von Pax 6 und ISL-1. Insgesamt waren die Genexpressionsveränderungen unter dem Breitspektrum-inhibitor

LBH589 stärker ausgeprägt als unter den Klasse-I-spezifischen Inhibitoren MS-275 und MGCD0103. Letztere zeigten im Gegensatz zu LBH589 keine signifikanten Veränderungen der untersuchten Gene.

5 Diskussion

Der Ersatz untergegangener Betazellen durch insulinproduzierende Zellen stellt einen experimentellen Ansatz zur Therapie des Diabetes mellitus Typ 1 dar. Die bis heute zur Verfügung stehende Therapie mittels exogenen Insulinapplikationen schafft es nur bedingt die Langzeitfolgen chronischer Hyperglykämien zu kontrollieren. Auch akut lebensbedrohliche Hypoglykämien durch inadäquate Insulinzufuhr stärken den Wunsch nach alternativen Behandlungsmöglichkeiten, sowohl beim Arzt als auch beim Patienten (Böhm et al. 2011; International Diabetes Federation 2015; American Diabetes Association 2003). Die Suche nach einer möglichst physiologischen Blutzuckerregulation steht hierbei im Vordergrund.

Eine Option stellt die allogene Inselzelltransplantation dar. Inselzellen von hirntoten Spendern können ABO-kompatibel transplantiert werden. Neben Hindernissen in der Transplantationstechnik lassen vor allem die nach Transplantation benötigte Immunsuppression mit teils schwerwiegenden Nebenwirkungen sowie die hohe Anzahl benötigter Spenderzellen bei limitiertem Angebot dieses Verfahren unattraktiv erscheinen. Auch die Lebensdauer transplantiertter Inselzellen ist zum aktuellen Zeitpunkt noch stark eingeschränkt (Rekittke et al. 2016; Bellin et al. 2012; Shapiro et al. 2006; Bellin et al. 2012).

Diesem Problem entgegend gewinnt die Herstellung von insulinproduzierenden Zellen aus körpereigenen Stammzellen mit konsekutiver, autologer Transplantation zunehmend an Bedeutung. Zum heutigen Zeitpunkt existieren eine Reihe verschiedener Differenzierungsprotokolle, die die Entwicklung von insulinproduzierenden Zellen aus sowohl embryonalen, mesenchymalen oder induziert-pluripotenten Stammzellen verfolgen (Rekittke et al. 2016).

Einige dieser Protokolle nutzen Histondeacetylase-Inhibitoren (HDACi). HDACi führen u.a. durch acetylierte Histonmodifikationen zu gelockertem Chromatin und somit zu erhöhter Genexpression unterschiedlicher Gene. Sie können dadurch Einfluss auf die Differenzierung von Stammzellen nehmen und kontrollieren eine Vielzahl verschiedener Differenzierungsvorgänge (Karantzali et al. 2008; Thatava et al. 2006; Haumaitre et al. 2008, 2009; Kurihara et al. 2014; An et al. 2014; Li et al. 2008).

In dieser Arbeit wurde untersucht, ob die Klasse-I-spezifischen HDACi MS-275 und MGCD0103 sowie der Breitspektrum HDACi LBH589 Einfluss auf die Differenzierung von humanen, mesenchymalen Stammzellen haben, und ob es diesbezüglich

Unterschiede zwischen den jeweils genutzten Substanzen gibt. Die Wirkung dieser Inhibitoren speziell auf die endokrinen Transkriptionsfaktoren ISL-1 und Pax6 wurde untersucht um festzustellen, ob sich einer der HDACi für weitere Differenzierungsprotokolle eignet, um Stammzellen in Richtung endokrine Zellen zu lenken.

Ein Vorteil der genutzten Substanzen ist, dass diese sich bereits im klinischen Einsatz befinden bzw. in vorklinischen Studien gut an Patienten untersucht sind und auf ihre Sicherheit in der Anwendung geprüft wurden (Bolden et al. 2006; West und Johnstone 2014; Novartis 2015; Fournel et al. 2008; Nebbioso et al. 2012; Guha 2015; San-Miguel et al. 2014).

5.1 Real-time PCR Untersuchung der Genexpression endokriner Transkriptionsfaktoren unter der Behandlung mit HDACi

Durch die Untersuchung der Genexpression von differenzierungsrelevanten Transkriptionsfaktoren in humanen, mesenchymalen Stammzellen unter der Behandlung mit HDACi konnten wir zeigen, dass

- i) Der Breitspektrum-inhibitor LBH589 die Expression von ISL-1 bereits nach sechsstündiger Zellkultur signifikant erhöht und dass es nach einem erneuten Abfall des Expressionslevels zu einem Wiederanstieg und zur signifikanten Erhöhung nach fünf Tagen kommt.
- ii) LBH589 die Expression des endokrinen Transkriptionsfaktors Pax6 nach zweitägiger Zellkultur signifikant erhöht
- iii) Die Klasse-I spezifischen HDACi MS-275 und MGCD0103 keine Veränderung der untersuchten Transkriptionsfaktoren bewirkten
- iv) Es zu keiner Veränderung in der Genexpression der Stammzellmarker Thy-1 und SCF kam

Unsere real-time PCR Analyse der Expressionsveränderung der Transkriptionsfaktoren Pax6 und ISL-1 zeigte unter der fünftägigen Behandlung der humanen mesenchymalen Stammzellen eine Heraufregulation unter LBH589 (Panobinostat). Dies konnte unter Behandlung mit den Schmalspektrum-inhibitoren MS-275 (Entinostat) und MGCD0103 (Mocetinostat) nicht gezeigt werden.

LBH589 wirkt inhibitorisch auf die HDACs der Klassen I (HDAC 1, 2, 3, 8), II (HDAC 4, 5, 6, 7, 9, 10) und IV (HDAC 11). Im Gegensatz dazu wirkt MS-275 sehr spezifisch auf HDAC 1, 2, 3. MGCD0103 inhibiert selektiv die HDACs 1, 2, 3 und 11 (Atadja 2009; Xu et al. 2007; Fournel et al. 2008).

Hieraus kann schlussgefolgert werden, dass die Heraufregulation der endokrinen Transkriptionsfaktoren möglicherweise durch die Inhibition der Klasse II HDACs zustande kommt bzw. dass wichtige Schritte in der endokrinen Zelldifferenzierung durch HDACs der Klasse II reguliert werden. Würden die Klasse I und IV HDACs hier wichtige regulatorische Checkpoints kontrollieren, so hätte man vermutlich auch unter den Inhibitoren MS-275 und MGCD0103 Veränderungen in der Genexpression messen können.

Generell ist bekannt, dass den Klasse II HDACs eine Rolle bei der zellspezifischen Differenzierung und Wachstumssteuerung zukommt. Sie fungieren als Korepressoren der Transkription. Eine Inhibition dieser Enzyme hat somit eine verstärkte Transkription von differenzierungsrelevanten Transkriptionsfaktoren zur Folge (Wang et al. 2014; Yang und Gregoire 2005; Fischle et al. 2001; Dressel et al. 2001; Martin et al. 2007; Martin et al. 2009).

Passend zu unserer Annahme, dass LBH589 mittels Inhibition der Klasse-II HDACs die endokrine pankreatische Differenzierung beeinflusst, wurde gezeigt, dass genau diese HDACs eine zentrale Rolle der Betazellentwicklung bei der Maus einnehmen. Im Gegensatz zu den anderen HDACs besitzt diese Klasse ein sehr gewebsspezifisches Expressionsmuster. Es wurde gezeigt, dass sich die Expression der HDAC 4, 5, 9 im Mäusepankreas auf Beta- und Deltazellen beschränkt. HDAC 4-, 5- und 9-defiziente Mäuse zeigten im Gegensatz zum Wildtyp eine erhöhte Betazellmasse. Ergänzend hierzu bewirkte die Überexpression von HDAC 4 oder 5 eine Reduktion der Beta- und Deltazellmasse innerhalb des Pankreas (Lenoir et al. 2011).

Der Einsatz selektiver HDAC-Inhibitoren alleine oder in Kombination ist generell ein vielversprechendes Prinzip zur Steuerung von Zelldifferenzierungsprozessen. In den Untersuchungen dieser Arbeit zeigte sich jedoch kein Effekt der Klasse-I-spezifischen HDACi MS-275 oder MGCD0103 auf die Expression von endokrinen Transkriptionsfaktoren. In Anbetracht der obig diskutierten Ergebnisse könnten möglicherweise Schmalspektrum-inhibitoren, die selektiv HDACs der Klasse II hemmen, genutzt werden, um die endokrine Zellentwicklung der mesenchymalen Stammzellen zu

fördern. Im embryonalen Rattenpankreas wurde gezeigt, dass die Behandlung mit einem selektiven Klasse-II Inhibitor, MC1568, den Beta- und Deltazellpool im Vergleich zur Kontrolle erhöhte. (Lenoir et al. 2011) Breitspektrum-Inhibitoren und Klasse-I-spezifische HDACi sind gut untersucht, klinisch getestet und eine Reihe verschiedener Substanzen steht hier zur Verfügung. Die Entwicklung selektiver Klasse II Inhibitoren stellt zurzeit noch ein großes Forschungsfeld dar. Eine neuere Substanz ist beispielsweise der HDACi WO2014181137, welcher sehr spezifisch die HDAC 6 hemmt. Weitere Substanzen wie TMP195 oder MC1568 wirken breiter innerhalb der Klasse II und inhibieren hier die HDACs 4, 5, 7, 9. Solche Klasse-II spezifischen Substanzen könnten für weitere Differenzierungsprotokolle interessant werden. Weitere Untersuchungen an humanen Stammzellen werden hier benötigt (Simoes-Pires et al. 2017; Amengual et al. 2016; West und Johnstone 2014; Lobera et al. 2013; Nebbioso et al. 2009; Mai et al. 2005).

In der real-time PCR Untersuchung zeigte sich bei der Expression von ISL-1 ein dynamisches Muster der Regulation. Nach einem frühen signifikanten Anstieg der Expression kam es zunächst wieder zu einem Abfall mit folgendem Wiederanstieg bis zu dem Endpunkt nach fünf Tagen. Ein Erklärungsversuch für diesen „frühen“ und „späten“ Expressionsanstieg wäre, dass die Genregulation mittels Panobinostat über verschiedene Wege vollzogen wird, die sich in ihrem zeitlichen Gefüge unterscheiden.

Zum einen entsteht durch die breite Inhibition von HDACs eine hyperacetylierte Chromatinstruktur, eine Vielzahl verschiedener Gene wird somit zur Transkription freigelegt. An den Promotoren aktivierter Gene findet sich eine hohe Anzahl acetylierter Gene (de Ruijter, Annemieke J M et al. 2003; Allfrey et al. 1964; Deckert und Struhl 2001; Di Cerbo et al. 2014). Somit könnten die erhöhten Transkriptionslevel von Pax6 und ISL-1 über diesen Mechanismus erklärt werden.

Ein solcher Prozess mit zunächst Freilegung der Gene und Rekrutierung der benötigten Transkriptionsmaschinerie könnte für die Expressionsanstiege von ISL-1 nach fünf Tagen und Pax6 nach zwei Tagen Zellkultur verantwortlich sein. In unserer Arbeitsgruppe wurde gezeigt, dass die Anzahl acetylierter Histone in einer Panc1 Zelllinie unter der Behandlung mit einem HDACi nach fünf Tagen deutlich zunimmt (Schindler 2013).

In welcher Zeit die HDAC-Inhibition eine Acetylierung der Histone mit folgender Genexpression bewirkt, hängt jedoch auch von dem jeweiligen Zelltyp ab. Konträr zu obig aufgestellter Theorie zeigt der Breitspektrum-HDACi TSA in embryonalen

Stammzellen der Maus schon nach sechs bis 12 stündiger Wirkung eine Zunahme des Acetylierungsstatus des Histons H3 (Karantzali et al. 2008).

Für LBH589 wurde gezeigt, dass es neben der histonmodifizierende Wirkung eine zusätzliche Wirkung auf miRNAs aufweist und hierüber Einfluss auf die Genexpression und den Alterungsprozess einer Zelle vermittelt. Dies wäre ein weiterer möglicher Weg, über den LBH589 die Expression der Transkriptionsfaktoren steuert (Hoffend et al. 2017; Di Fazio et al. 2013; Henrici et al. 2015; Cho et al. 2015).

MiRNAs sind kurze, nicht kodierende RNAs welche die post-transkriptionale Genexpression regulieren. Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Differenzierung von Zellen im Allgemeinen und auch bei der Entwicklung von Langerhans-Inselzellen, sowie Betazellen im Speziellen. Geschätzt werden bis zu 30% des Genoms bei Säugetieren über miRNAs reguliert (Chen et al. 2006; Sluijter et al. 2010; Klein et al. 2013; Joglekar et al. 2009; Correa-Medina et al. 2009; Bartel 2004; Lewis et al. 2005).

LBH589 tritt mit einer Vielzahl verschiedener miRNAs in Wechselwirkung. So konnte bei Zelllinien des hepatozellulären Karzinoms gezeigt werden, dass Panobinostat zur Heraufregulation der miRNA miR-7 führt (Henrici et al. 2015; Di Fazio et al. 2013). Diese spielt eine wichtige Rolle bei der endokrinen pankreatischen Entwicklung. Sie ist während der humanen Pankreasentwicklung stark exprimiert und findet sich zu späteren Zeitpunkten als eine der häufigsten miRNAs in den Langerhans-Inseln des Menschen und der Ratte (Joglekar et al. 2009; Bravo-Egana et al. 2008). Eine Inhibition der miR-7 führt zu einer abnehmenden Insulinproduktion und zur Reduktion der Betazellmasse (Nieto et al. 2012). Somit ist es möglich, dass Panobinostat durch Regulation der miR-7 Einfluss auf die Differenzierung der humanen, mesenchymalen Stammzelllinie nimmt. Andere miRNAs, die eine Rolle bei der humanen Pankreasentwicklung zu spielen scheinen (miR-9, miR375, miR-376) könnten hier ebenfalls Einfluss haben (Joglekar et al. 2009). Weitere Untersuchungen der Expression dieser miRNAs unter LBH589 müssten folgen, um diese These zu bestätigen.

Eine Wirkung auf miR-7 oder andere pankreatische miRNAs ist für die Klasse I spezifischen HDACi MS-275 und MGCD0103, soweit uns bekannt, aktuell nicht beschrieben. Ein Unterschied zwischen LBH589 und den Klasse I spezifischen HDACi in der Wirkung auf miRNA könnte unsere Ergebnisse aus der real-time PCR ebenfalls erklären. Eine genaue Analyse und Kenntnis der verschiedenen Regulationswege während der Pankreasentwicklung ist entscheidend für den Erfolg von

Differenzierungsprotokollen.

Eine mesenchymale Stammzelle ist unter anderem über ihre Oberflächenmoleküle identifizierbar. Thy-1 (CD90) gilt als Marker für mesenchymale Stammzellen (Dominici et al. 2006). Wir untersuchten dessen Regulation unter der Behandlung mit o.g. HDACi. Initial hatten wir erwartet, dass die Expression von Thy-1 herunterreguliert werden müsste, sollte eine Differenzierung der Zelle stattfinden. In embryonalen Stammzellen der Maus führte eine Behandlung mit dem Breitspektrum-HDACi TSA zur Herunterregulation von Nanog, einem Marker für die Pluripotenz der embryonalen Stammzelle (Karantzali et al. 2008). Dies trifft in unserem Versuch nach fünftägiger Behandlung der Zellen für keinen der genutzten HDACi zu. Eine Erklärung hierfür könnte sein, dass die Zelle noch im Stadium der mesenchymalen Stammzelle verbleibt, trotz Hochregulation von Pax6 und ISL-1 unter LBH589. Wahrscheinlich eignet sich dieser Inhibitor nur als supportive Substanz für Differenzierungsprotokolle, eine vollständige Differenzierung der mesenchymalen Stammzellen zu einer erkennbaren somatischen Zelllinie unter alleiniger LBH589 Behandlung konnte nicht erzielt werden. Der Stammzellfaktor (stem cell factor, SCF) zeigte während des gesamten Versuchsaufbaus ebenfalls keine signifikante Genexpressionsveränderung. Dies hatten wir im Vorfeld erwartet, da SCF sowohl in Stammzellen, als auch während der endokrinen Pankreasentwicklung dynamisch exprimiert wird (Li et al. 2007).

Bezüglich der real-time PCR Ergebnisse bleibt kritisch anzumerken, dass wir mit der $\Delta\Delta CT$ Methode lediglich die Expressionsveränderung der Target Gene Pax6, ISL-1, Thy-1 und SCF im Vergleich zu dem HKG RPL13A gemessen haben, nicht aber deren absolute Expression. Im Vorfeld der real-time PCR Versuche haben wir eine Reihe verschiedener HKG getestet. RPL13A zeigte eine sehr stabile Expression über alle Versuchreihen hinweg mit einem geringen Varianzkoeffizienten, sodass wir von einem zuverlässigen Vergleichsgen für die relativen Veränderungen der Zielgene ausgehen können. Weiter sollte die Amplifikationseffizienz (AE) eines Primers, gemäß den MIQUE Guidelines (Minimum Information for Publication of Quantitative Real-Time PCR Experiments) 100% betragen (Bustin et al. 2009). Unsere Primer wurden mittels dem Programm primer3 und Primerblast berechnet und überprüft (siehe Material und Methoden). Diese Programme berechnen hochspezifische Sequenzen, wir nehmen deshalb eine AE von nahezu 100% an. Um noch genauere Ergebnisse zu erhalten müssten die jeweiligen Primer mittels DNA-Verdünnungsreihen auf ihre AE geprüft werden.

5.2 HDAC Aktivitäts-Assay

Bevor wir die Genexpressionsanalysen durchführten, musste bestätigt werden, dass die genutzten HDACi einen Effekt auf die hMSC-TERT Zelllinie aufweisen.

Durch die Durchführung des Aktivitätsassays konnten wir zeigen, dass

- i) Sowohl LBH589 als auch die Klasse I spezifischen HDACi MS-275 und MGCD0103 einen signifikanten HDAC-inhibitorischen Effekt auf die isolierten HDAC-Enzyme der hMSC ausüben
- ii) Alle drei Inhibitoren dosisabhängig eine antiproliferative Wirkung auf die hTERT-immortalisierten Zellen besitzen

Ein Hindernis, welches dem klinischen Einsatz von Stammzellen aktuell noch im Wege steht, ist das Risiko der Tumorbildung *in vivo* post Transplantation (Tolar et al. 2007; Mishra et al. 2009; Rubio et al. 2008; Rosland et al. 2009). Tang et al gelang es, humane mesenchymale Stammzellen zu insulinproduzierenden Zellen zu transdifferenzieren. Diese zeigten sich glukosesensitiv und senkten den Blutglukosespiegel bei diabetischen Mäusen *in vivo*. Jedoch kam es bei diesen Tieren nach 40-45 Tagen post Transplantation zu einer palpablen Tumormasse im Transplantatbereich der Nierenregion. Die histologische Untersuchung dieser Tumoren zeigte teils maligne Zellmorphologien (Tang et al. 2012a).

Auch wenn das Entartungsrisiko mesenchymaler Stammzellen aktuell kontrovers diskutiert wird, ist der definitive Ausschluss dieses Risikos notwendig, bevor diese Zellen Eingang in die klinische Praxis erhalten können (Tarte et al. 2010).

HDACi sind etablierte Substanzen in der Tumorthherapie. Sie sind klinisch getestet im Bereich hämato-onkologischer Neoplasien und zeigen hier in Krebszellen eine Heraufregulation proapoptotischer Proteine sowie eine Herunterregulation anti-apoptotischer Gene. Sie wirken antiproliferativ, induzieren Differenzierung und führen zur Apoptose von Tumorzellen (West und Johnstone 2014; Rasheed et al. 2007; Center for Drug Evaluation and Research; Mitsiades et al. 2004; Nebbioso et al. 2005; Richon et al. 2000; Salmon et al. 2015; Bots et al. 2014).

Zur Untersuchung von Differenzierungsmustern nutzten wir mittels einer Telomerase (humane Telomerase, hTERT) immortalisierte Stammzellen. Eine Überexpression dieser TERT findet sich auch in Tumorzellen (Kim et al. 1994; Shay und Bacchetti 1997). Eine

nahezu ungebremste, stetig fortschreitende Proliferation zeigte sich in unseren Versuchsreihen unter Kontrollbedingungen. Unter der Behandlung mit allen drei genutzten HDACi zeigte sich dosisabhängig eine antiproliferative Wirkung. Eine Behandlung der hTERT-MSK mit 20 nM LBH589 führte nach fünftägiger Zellkultur bei verlangsamter Proliferation zu einer Zellkonfluenz von 60 – 74%. Zellen die parallel unter Kontrollbedingungen einer im Vergleich deutlich gesteigerten Proliferation unterlagen zeigten nach fünf Tagen eine 100 %ige Zellkonfluenz, welche zum Absterben dieser Zellen aufgrund von Nährstoff- und Platzmangel in der Zellkulturschale führte.

LBH589 zeigte in einer Dosis von 20 nmol/l eine deutliche antiproliferative Wirkung bei nur geringem toxischen Effekt. Dies könnte neben der Differenzierungsförderung ein positiver Nutzen dieses HDACi in weiteren Protokollen darstellen.

Auch die klinisch getestete Sicherheit von LBH589 eröffnet durchaus die Optionen einer Differenzierungs- und Tumorkontrolle transplantierte Stammzellen in vivo post Transplantation.

Zusammenfassend wurde in dieser Arbeit gezeigt, dass LBH589 eine differenzierungsfördernde Wirkung auf humane mesenchymale Knochenmarksstammzellen hat, wahrscheinlich über die Inhibition von Klasse II HDACs. MS-275 und MGCD0103 hatten keinen signifikanten Effekt auf die Expression der untersuchten endokrinen Transkriptionsfaktoren. Weitere Untersuchungen mittels Klasse II spezifischen HDACi können hier folgen. Zusätzlich wurde gezeigt, dass die verwendeten Inhibitoren einen antiproliferativen Effekt auf die sich schnell teilenden MSC hatten. Somit werden diese Substanzen besonders in Hinsicht auf Tumorkontrolle innerhalb von Differenzierungsprotokollen und post Transplantation in vivo interessant.

5.3 PCR und Agarosegelelektrophorese

Mittels der PCR und anschließender Gelelektrophorese konnten wir zeigen, dass die unbehandelten Zellen der hMSC-TERT Stammzelllinie eine basale Expression von Pax6 und ISL-1 aufweisen. Eine basale Expression von ISL-1 in humanen ADSC und deren weitere Differenzierungswege wurden bereits durch Timper et al. aufgezeigt. Das Vorhandensein von Pax6 und ISL-1 in der noch undifferenzierten hMSC-TERT Stammzelllinie könnte auf das Differenzierungspotential dieser Zellen in Richtung endokrinen Pankreas hindeuten (Timper et al. 2006).

6 Zusammenfassung

Die Transplantation von insulinproduzierenden Zellen, die aus körpereigenen Stammzellen gewonnen werden stellt einen experimentellen Ansatz zur Therapie des Diabetes mellitus Typ 1 dar.

In einer Reihe von Differenzierungsprotokollen werden Histondeacetylaseinhibitoren (HDACi) genutzt, um die Wirkung von differenzierungsrelevanten Faktoren mittels epigenetischer Modifikationen zu verstärken. HDACi führen u.a. durch Verstärkung acetylierter Histonmodifikationen zu gelockertem Chromatin und somit zu erhöhter Genexpression unterschiedlicher Gene. Sie können dadurch Einfluss auf die Differenzierung von Stammzellen nehmen und kontrollieren eine Vielzahl verschiedener Differenzierungsvorgänge. Wir untersuchten die isolierte Wirkung dieser HDACi auf humane, mesenchymale Stammzellen. Hierzu führten wir eine Zellkultur über fünf Tage durch und behandelten die Zellen mit einem Breitspektrum-inhibitor (LBH589), sowie mit den Klasse-I-spezifischen HDACi MS-275 und MGCD0103.

Zu definierten Zeitpunkten wurde die Genexpression des insulin gene enhancer protein (ISL-1) und des paired-box-gene 6 (Pax6) gemessen, zwei Transkriptionsfaktoren, die eine Rolle bei der Embryogenese des Pankreas spielen.

In den mit LBH589 behandelten Zellen zeigte sich eine signifikante Erhöhung der Genexpression dieser Gene in dynamischem Muster. Die Klasse-I-spezifischen HDACi zeigten hingegen keine signifikante Beeinflussung der untersuchten Gene.

Alle drei HDACi hatten einen antiproliferativen Effekt auf eine Telomerase-immortalisierte Stammzelllinie. LBH589 ist ein klinisch etablierter HDACi im Bereich hämato-onkologischer Neoplasien. Er wirkt antiproliferativ, induziert Differenzierung und führt zur Apoptose von Tumorzellen. Dies könnte helfen dem aktuell bestehenden Problem einer Tumorformation nach Transplantation zu entgegnen.

LBH589 als Breitspektrum-inhibitor präsentiert somit zwei wichtige Eigenschaften, die ihn für weitere Einsätze in Differenzierungsprotokollen attraktiv erscheinen lassen.

7 Summary

The application of insulin producing cells, which are obtained from autologous mesenchymal stem cells represents an experimental approach for the treatment of type I diabetes.

There are several differentiation protocols in which Histone deacetylase- Inhibitors (HDACi) are used to enhance the effect of transcription factors by modifying epigenetic signals.

They inhibit HDACs and thereby lead to prevention of condensed DNA structure, following activation of gene transcription.

Panobinostat (LBH-589) is a broad spectrum Inhibitor, which inhibits HDACs of class I as well as class II and IV. Entinostat (MS-275) and Mocetinostat (MGCD0103) are specific for class I HDACs.

To analyze the effect of histone-deacetylase inhibition on human mesenchymal stem cells, we performed cell culture for five days, using the broad-spectrum HDACi LBH589 as well as the class-I-specific HDACi MS-275 and MGCD0103.

After 6h, 24h, 48h and 120h we measured the expression of insulin gene enhancer protein (ISL-1) and paired-box-gene 6 (Pax6), two markers for Langerhans-cell development, by using real-time PCR.

We found that HDAC inhibition by LBH589 upregulates the expression of these genes in a significant way, whereas MS-275 and MGCD0103 did not show any significant changes in gene expression.

Furthermore all of the three HDACi showed an antiproliferative effect on telomerase immortalized stem cells. LBH589 has already proved its anticancer activity in clinical use.

This feature might offer the possibility to prevent tumor formation after transplantation of differentiated stem cells in vivo.

Taken together, LBH589 as a broad-spectrum HDACi offers the opportunity to be used as a component in further differentiation protocols to support differentiation as well as to prevent tumor formation.

8 Abkürzungsverzeichnis

ACTB	Actin beta
ADSC	Adipose-tissue derived stem cells, Fettgewebstammzellen
AMC	7-amino-4-methylcoumarin
APC	Allophycocyanin
B2M	Beta-2 microglobulin
cDNA	Complementary DANN, komplementäre DNS
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonnucleinsäure
EDTA	Ethylenediaminetetraacetic acid
ESC	Embryonalen Stammzelle
FCS	Fetal Calf Serum
FITC	Fluorescein Isothiocyanat
FSC	Forward Scatter, Vorwärtsstreulicht
FDA	Food and Drug Administration (USA)
GAPD	Glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase
GSIS	Glucosestimulierte Insulinsekretion
GUSB	Glucuronidase beta
H3K64ac	Acetylierung des Lysin 64 an Histon H3
HAT	Histon Acetyltransferasen
HDAC	Histon Desacetylase
HDACi	HDAC- Inhibitor
hESC	Humane embryonale Stammzelle
HKG	House keeping gene, Haushaltsgen
hMSC	Humane mesenchymale Stammzelle
hMSC-TERT	Humane mesenchymale Knochenmarksstammzelllinie, Telomerase-immortalisiert
HPRT1	Hypoxanthine phosphoribosyltransferase 1
hPSC	Humanen pluripotente Stammzelle
hTERT	Humane Telomerase

IC50	Inhibitorische Konzentration: 50% der Enzyme gehemmt
ISL-1	Insulin-gene-enhancer binding Protein
MEM	Minimum essential Medium
MSC	Mesenchymale Stammzelle
MW	Mittelwert
NaB	Natriumbutyrat
OAD	Orale Antidiabetika
Pax6	Paired box 6
PBS	Phosphate buffered saline
p.c.	Post conceptionem
PCR	Polymerasekettenreaktion
PE	Phycoerythrin
PerCP-Cy5.5	Peridin-Chlorophyll-Proteinkomplex und Cyaninfarbstoff
PGK	Phosphoglycerate kinase
PP1A	Protein Phosphatase 1
RIPA	Radioimmunoprecipitation assay buffer
RNA	Ribonucleic acid, Ribonukleinsäure
RPL13A	Ribosomal protein L13a
SAHA	Suberoylanilide hydroxamic acid
SCC	Side Scatter, Seitwärtsstreulicht
SCF	Stammzellfaktor
SDS	Sodium dodecyl sulfate
SEM	Mittlerer Fehler des Mittelwertes
TAE Puffer	TRIS-Acetat-EDTA- Puffer
TBP	TATA-box binding protein
TFRC	Transferrin receptor
TSA	Trichostatin A
Thy-1	Thymocyte antigen 1
YWHAZ	Tyrosine 3-monooxygenase/tryptophan 5-monooxygenase activation protein zeta

9 Abbildungsverzeichnis

Abbildung 1: Strukturformel von LBH589.....	12
Abbildung 2: Strukturformel von MS-275.....	13
Abbildung 3: Strukturformel von MGCD0103.....	14
Abbildung 4: Festlegung der Quadrantenmarker.....	36
Abbildung: 5HDAC-Assay Prinzip.....	40
Abbildung 6 Durchflusszytometrische Zellcharakterisierung.....	54
Abbildung 7: Vergleich der mesenchymalen Oberflächenmarker.....	55
Abbildung 8: Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von verschiedenen Lysepuffersystemen.....	57
Abbildung 9: Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von der Proteinmenge.....	58
Abbildung 10: Fluoreszenzintensität in Abhängigkeit von unterschiedlichen Substratkonzentrationen.....	59
Abbildung 11: Fluoreszenz aufgrund des Spontanzerfalls.....	59
Abbildung 12: Zeitabhängige inhibitorische Wirkung von LBH589.....	60
Abbildung 13: Zeitabhängige Unterschiede in der Fluoreszenzintensität zwischen einer 20 nM LBH589 Konzentration und der 0nM-Kontrolle.....	62
Abbildung 14: Zellmorphologie unter LBH589.....	62
Abbildung 15 : Zellkonfluenzmessung unter LBH589.....	63
Abbildung 16: Zeitabhängige inhibitorische Wirkung von MS-275.....	63
Abbildung 17: Zeitabhängige Unterschiede in der Fluoreszenzintensität zwischen einer 1,5 µM MS-275 Konzentration und der 0nM-Kontrolle.....	64
Abbildung 18: Zeitabhängige inhibitorische Wirkung von MGCD0103.....	65
Abbildung 19: Vergleich der Zellmorphologie unter MGCD0103.....	66
Abbildung 20: Agarose-Gelelektrophorese der PCR Produkte.....	68
Abbildung 21: Genexpressionsanalyse von Kontrollzellen.....	70
Abbildung 22: Genexpressionsanalyse LBH589-behandelter Zellen.....	71
Abbildung 23: Genexpressionsanalyse MS-275-behandelter Zellen.....	72
Abbildung 24: Genexpressionsanalyse MGCD0103 behandelte Zellen.....	73

10 Tabellenverzeichnis

Tabelle 1: Auswahl einiger Vertreter der HDACi	9
Tabelle 2: HDACi in klinischer Anwendung.	11
Tabelle 3: Gliederung der durchflusszytometrischen Analyse.	35
Tabelle 4: Pipettierschema des HDAC-Assays.	42
Tabelle 5: Pipettierschema für Lysepuffer- und Lysatbestimmung.	43
Tabelle 6: Verdünnungsschema zum Erreichen der gewünschten Endkonzentration des Substrates im Versuchsaufbau der Substratbestimmung.	45
Tabelle 7: Pipettierschema zur Bestimmung einer geeigneten Substratmenge.	46
Tabelle 8: Darstellung der verwendeten Primer.	49
Tabelle 9: Übersicht über die verwendeten HKG.	50
Tabelle 10: Aus Zelllysaten erhaltene Proteinmenge	56
Tabelle 11: Ranking der HKGs. Sortiert nach dem mittleren CT-Wert.	67
Tabelle 12: Ranking der HKGs, sortiert anhand des Varianzkoeffizienten.	68

11 Literaturverzeichnis

Abdallah, M.; Haack-Sorensen, M.; Burns, Jorge S.; Elsnab, B.; Jakob, F.; Hokland, P.; Kassem, M. (2005): Maintenance of differentiation potential of human bone marrow mesenchymal stem cells immortalized by human telomerase reverse transcriptase gene despite corrected extensive proliferation. In: *Biochemical and biophysical research communications* 326 (3), S. 527–538. DOI: 10.1016/j.bbrc.2004.11.059.

Ahlgren, U.; Pfaff, S. L.; Jessell, T. M.; Edlund, T.; Edlund, H. (1997): Independent requirement for ISL1 in formation of pancreatic mesenchyme and islet cells. In: *Nature* 385 (6613), S. 257–260. DOI: 10.1038/385257a0.

Allfrey, V. G.; Faulkner, R.; Mirsky, A. E. (1964): ACETYLATION AND METHYLATION OF HISTONES AND THEIR POSSIBLE ROLE IN THE REGULATION OF RNA SYNTHESIS. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 51 (5), S. 786–794.

Allsopp, R. C.; Vaziri, H.; Patterson, C.; Goldstein, S.; Younglai, E. V.; Futcher, A. B. et al. (1992): Telomere length predicts replicative capacity of human fibroblasts. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 89 (21), S. 10114–10118.

Amengual, J. E.; Prabhu, S. A.; Lombardo, M.; Zullo, K.; Johannet, P. M.; Gonzalez, Y. et al. (2016): Mechanisms of Acquired Drug Resistance to the HDAC6 Selective Inhibitor Ricolinostat Reveals Rational Drug-Drug Combination with Ibrutinib. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research*. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-16-2022.

American Diabetes Association (2003): Report of the expert committee on the diagnosis and classification of diabetes mellitus. Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. In: *Diabetes care* 26 Suppl 1, S. S5-20.

An, Su Y.; Han, J.; Lim, H.-J.; Park, S.-Y.; Kim, J. H.; Do, B.-R.; Kim, J.-H. (2014): Valproic acid promotes differentiation of hepatocyte-like cells from whole human umbilical cord-derived mesenchymal stem cells. In: *Tissue & cell* 46 (2), S. 127–135. DOI: 10.1016/j.tice.2013.12.006.

Arzneimittelkommission der deutschen Ärzteschaft; Deutsche Diabetes Gesellschaft; Deutsche Gesellschaft für Allgemeinmedizin und Familienmedizin; Deutsche Gesellschaft für Innere Medizin; Verband der Diabetesberatungs- und Schulungsberufe Deutschland; Ärztliches Zentrum für Qualität in der Medizin (2013): Nationale VersorgungsLeitlinie Therapie des Typ-2-Diabetes - Kurzfassung, 1. Auflage: Bundesärztekammer (BÄK); Kassenärztliche Bundesvereinigung (KBV); Arbeitsgemeinschaft der Wissenschaftlichen Medizinischen Fachgesellschaften (AWMF).

Assouline, S. E.; Nielsen, T. H.; Yu, S.; Alcaide, M.; Chong, L.; MacDonald, D. et al. (2016): Phase 2 study of panobinostat with or without rituximab in relapsed diffuse large B-cell lymphoma. In: *Blood* 128 (2), S. 185–194. DOI: 10.1182/blood-2016-02-699520.

Atadja, P. (2009): Development of the pan-DAC inhibitor panobinostat (LBH589): successes and challenges. In: *Cancer letters* 280 (2), S. 233–241. DOI: 10.1016/j.canlet.2009.02.019.

Augustinus Aurelius (354 - 430), 354 - 430.

Bali, P.; Pranpat, M.; Bradner, J.; Balasis, M.; Fiskus, W.; Guo, F. et al. (2005): Inhibition

of histone deacetylase 6 acetylates and disrupts the chaperone function of heat shock protein 90: a novel basis for antileukemia activity of histone deacetylase inhibitors. In: *The Journal of biological chemistry* 280 (29), S. 26729–26734. DOI: 10.1074/jbc.C500186200.

Bartel, D. P. (2004): MicroRNAs: genomics, biogenesis, mechanism, and function. In: *Cell* 116 (2), S. 281–297.

Bellin, M. D.; Barton, F. B.; Heitman, A.; Harmon, J. V.; Kandaswamy, R.; Balamurugan, A. N. et al. (2012): Potent induction immunotherapy promotes long-term insulin independence after islet transplantation in type 1 diabetes. In: *American journal of transplantation : official journal of the American Society of Transplantation and the American Society of Transplant Surgeons* 12 (6), S. 1576–1583. DOI: 10.1111/j.1600-6143.2011.03977.x.

Berg, J. M.; Tymoczko, J. L.; Stryer, L.; Gatto, G. J. (2014): Biochemie. 7. Aufl., korr. Nachdr. Berlin: Springer Spektrum (Lehrbuch).

Best, M.; Carroll, M.; Hanley, N. A.; Piper Hanley, K. (2008): Embryonic stem cells to beta-cells by understanding pancreas development. In: *Molecular and cellular endocrinology* 288 (1-2), S. 86–94. DOI: 10.1016/j.mce.2008.03.008.

Bieback, K.; Kern, S.; Kluter, H.; Eichler, H. (2004): Critical parameters for the isolation of mesenchymal stem cells from umbilical cord blood. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 22 (4), S. 625–634. DOI: 10.1634/stemcells.22-4-625.

Black, I. B.; Woodbury, D. (2001): Adult rat and human bone marrow stromal stem cells differentiate into neurons. In: *Blood cells, molecules & diseases* 27 (3), S. 632–636. DOI: 10.1006/bcmd.2001.0423.

Boffa, L. C.; Vidali, G.; Mann, R. S.; Allfrey, V. G. (1978): Suppression of histone deacetylation in vivo and in vitro by sodium butyrate. In: *The Journal of biological chemistry* 253 (10), S. 3364–3366.

Böhm, B.; Dreyer, M.; Fritsche, A.; Füchtenbusch, M.; Gölz, S.; Martin, S. (2011): Therapie des Typ-1-Diabetes. In: *Diabetologie und Stoffwechsel* 6 (S 02), S. 120–130. DOI: 10.1055/s-0031-1283736.

Bolden, J. E.; Peart, M. J.; Johnstone, R. W. (2006): Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. In: *Nature reviews. Drug discovery* 5 (9), S. 769–784. DOI: 10.1038/nrd2133.

Bots, M.; Verbrugge, I.; Martin, B. P.; Salmon, J. M.; Ghisi, M.; Baker, A. et al. (2014): Differentiation therapy for the treatment of t(8;21) acute myeloid leukemia using histone deacetylase inhibitors. In: *Blood* 123 (9), S. 1341–1352. DOI: 10.1182/blood-2013-03-488114.

Bravo-Egana, V.; Rosero, S.; Molano, R. D.; Pileggi, A.; Ricordi, C.; Dominguez-Bendala, J.; Pastori, R. L. (2008): Quantitative differential expression analysis reveals miR-7 as major islet microRNA. In: *Biochemical and biophysical research communications* 366 (4), S. 922–926. DOI: 10.1016/j.bbrc.2007.12.052.

Briscoe, J.; Pierani, A.; Jessell, T. M.; Ericson, J. (2000): A homeodomain protein code specifies progenitor cell identity and neuronal fate in the ventral neural tube. In: *Cell* 101 (4), S. 435–445.

Bu, L.; Jiang, X.; Martin-Puig, S.; Caron, L.; Zhu, S.; Shao, Y. et al. (2009): Human ISL1 heart progenitors generate diverse multipotent cardiovascular cell lineages. In: *Nature*

460 (7251), S. 113–117. DOI: 10.1038/nature08191.

Bundesministerium der Justiz und für Verbraucherschutz (13.12.1990): Embryonenschutzgesetz vom 13. Dezember 1990 (BGBl. I S. 2746), das zuletzt durch Artikel 1 des Gesetzes vom 21. November 2011 (BGBl. I S. 2228) geändert worden ist. ESchG. Fundstelle: <http://www.gesetze-im-internet.de/eschg/>. Online verfügbar unter <http://www.gesetze-im-internet.de/eschg/>, zuletzt geprüft am 21.11.2011.

Bustin, S. A.; Benes, V.; Garson, J. A.; Hellemans, J.; Huggett, J.; Kubista, M. et al. (2009): The MIQE guidelines: minimum information for publication of quantitative real-time PCR experiments. In: *Clinical chemistry* 55 (4), S. 611–622. DOI: 10.1373/clinchem.2008.112797.

Cai, C.-L.; Liang, X.; Shi, Y.; Chu, P.-H.; Pfaff, S. L.; Chen, J.; Evans, S. (2003): Isl1 identifies a cardiac progenitor population that proliferates prior to differentiation and contributes a majority of cells to the heart. In: *Developmental cell* 5 (6), S. 877–889.

Castaing, M.; Duvillie, B.; Quemeneur, E.; Basmaciogullari, A.; Scharfmann, R. (2005): Ex vivo analysis of acinar and endocrine cell development in the human embryonic pancreas. In: *Developmental dynamics : an official publication of the American Association of Anatomists* 234 (2), S. 339–345. DOI: 10.1002/dvdy.20547.

Center for Drug Evaluation and Research: About the Center for Drug Evaluation and Research - FDA approves vorinostat (Zolinza) for the treatment of cutaneous manifestations of cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). Center for Drug Evaluation and Research. Online verfügbar unter <http://www.fda.gov/aboutfda/centersoffices/officeofmedicalproductsandtobacco/cder/ucm094952.htm>, zuletzt geprüft am 13.12.2015.

Chandra, V.; Swetha, G.; Phadnis, S.; Nair, P. D.; Bhonde, R. R. (2009): Generation of pancreatic hormone-expressing islet-like cell aggregates from murine adipose tissue-derived stem cells. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 27 (8), S. 1941–1953. DOI: 10.1002/stem.117.

Chang, K.-A.; Lee, J.-H.; Suh, Y.-H. (2014): Therapeutic potential of human adipose-derived stem cells in neurological disorders. In: *Journal of pharmacological sciences* 126 (4), S. 293–301. DOI: 10.1254/jphs.14R10CP.

Chen, J.-F.; Mandel, E. M.; Thomson, J. M.; Wu, Q.; Callis, T. E.; Hammond, S. M. et al. (2006): The role of microRNA-1 and microRNA-133 in skeletal muscle proliferation and differentiation. In: *Nature genetics* 38 (2), S. 228–233. DOI: 10.1038/ng1725.

Cho, J.-H.; Dimri, M.; Dimri, G. P. (2015): MicroRNA-31 is a transcriptional target of histone deacetylase inhibitors and a regulator of cellular senescence. In: *The Journal of biological chemistry* 290 (16), S. 10555–10567. DOI: 10.1074/jbc.M114.624361.

Cordle, S. R.; Henderson, E.; Masuoka, H.; Weil, P. A.; Stein, R. (1991): Pancreatic beta-cell-type-specific transcription of the insulin gene is mediated by basic helix-loop-helix DNA-binding proteins. In: *Molecular and cellular biology* 11 (3), S. 1734–1738.

Correa-Medina, M.; Bravo-Egana, V.; Rosero, S.; Ricordi, C.; Edlund, H.; Diez, J.; Pastori, R. L. (2009): MicroRNA miR-7 is preferentially expressed in endocrine cells of the developing and adult human pancreas. In: *Gene expression patterns : GEP* 9 (4), S. 193–199. DOI: 10.1016/j.gep.2008.12.003.

Cvekl, A.; Callaerts, P. (2016): PAX6: 25th anniversary and more to learn. In: *Experimental eye research*. DOI: 10.1016/j.exer.2016.04.017.

D'Amour, K.A.; Agulnick, A. D.; Eliazer, S.; Kelly, O. G.; Kroon, E.; Baetge, E. E. (2005): Efficient differentiation of human embryonic stem cells to definitive endoderm. In: *Nature biotechnology* 23 (12), S. 1534–1541. DOI: 10.1038/nbt1163.

D'Amour, K. A.; Bang, A. G.; Eliazer, S.; Kelly, O. G.; Agulnick, A. D.; Smart, N. G. et al. (2006): Production of pancreatic hormone-expressing endocrine cells from human embryonic stem cells. In: *Nature biotechnology* 24 (11), S. 1392–1401. DOI: 10.1038/nbt1259.

Damschen, G.; Schönecker, D. (2003): Der moralische Status menschlicher Embryonen. Pro und contra Spezies-, Kontinuums-, Identitäts- und Potentialitätsargument. Berlin: De Gruyter (De Gruyter Studienbuch). Online verfügbar unter <http://www.degruyter.com/doi/book/10.1515/9783110899795>.

de Ruijter, A. J M; van Gennip, A. H.; Caron, H. N.; Kemp, S.; van Kuilenburg, A.B P (2003): Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. In: *The Biochemical journal* 370 (Pt 3), S. 737–749. DOI: 10.1042/BJ20021321.

Deckert, J.; Struhl, K. (2001): Histone acetylation at promoters is differentially affected by specific activators and repressors. In: *Molecular and cellular biology* 21 (8), S. 2726–2735. DOI: 10.1128/MCB.21.8.2726-2735.2001.

Di Cerbo, V.; Mohn, F.; Ryan, D. P.; Montellier, E.; Kacem, S.; Tropberger, P. et al. (2014): Acetylation of histone H3 at lysine 64 regulates nucleosome dynamics and facilitates transcription. In: *eLife* 3, S. e01632. DOI: 10.7554/eLife.01632.

Di Fazio, P.; Montalbano, R.; Quint, K.; Alinger, B.; Kemmerling, R.; Kiesslich, T. et al. (2013): The pan-deacetylase inhibitor panobinostat modulates the expression of epithelial-mesenchymal transition markers in hepatocellular carcinoma models. In: *Oncology letters* 5 (1), S. 127–134. DOI: 10.3892/ol.2012.951.

Dokmanovic, M.; Clarke, C.; Marks, P. A. (2007): Histone deacetylase inhibitors: overview and perspectives. In: *Molecular cancer research : MCR* 5 (10), S. 981–989. DOI: 10.1158/1541-7786.MCR-07-0324.

Dominici, M.; Le Blanc, K.; Mueller, I.; Slaper-Cortenbach, I.; Marini, Fc; Krause, Ds et al. (2006): Minimal criteria for defining multipotent mesenchymal stromal cells. The International Society for Cellular Therapy position statement. In: *Cytotherapy* 8 (4), S. 315–317. DOI: 10.1080/14653240600855905.

Dong, J.; Asa, S. L.; Drucker, D. J. (1991): Islet cell and extrapancreatic expression of the LIM domain homeobox gene *isl-1*. In: *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 5 (11), S. 1633–1641. DOI: 10.1210/mend-5-11-1633.

Drenckhahn, D.; Asan, E.; Benninghoff, A.; Benninghoff-Drenckhahn (Hg.) (2004): Herz-Kreislauf-System, lymphatisches System, endokrines System, Nervensystem, Sinnesorgane, Haut. 16., völlig neu bearb. Aufl. München: Elsevier Urban & Fischer (Anatomie, makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie / Benninghoff; Drenckhahn ; Bd. 2).

Drenckhahn, D.; Christ, B.; Benninghoff, A.; Benninghoff-Drenckhahn (Hg.) (2003): Zellen- und Gewebelehre, Entwicklungslehre, Skelett- und Muskelsystem, Atemsystem, Verdauungssystem, Harn- und Genitalsystem. 16., völlig neu bearb. Aufl. München: Urban & Fischer (Anatomie, makroskopische Anatomie, Histologie, Embryologie, Zellbiologie / Benninghoff; Drenckhahn ; Bd. 1).

Dressel, U.; Bailey, P. J.; Wang, S. C.; Downes, M.; Evans, R. M.; Muscat, G. E. (2001):

A dynamic role for HDAC7 in MEF2-mediated muscle differentiation. In: *The Journal of biological chemistry* 276 (20), S. 17007–17013. DOI: 10.1074/jbc.M101508200.

Du, A.; Hunter, C. S.; Murray, J.; Noble, D.; Cai, C.-L.; Evans, S. M. et al. (2009): Islet-1 is required for the maturation, proliferation, and survival of the endocrine pancreas. In: *Diabetes* 58 (9), S. 2059–2069. DOI: 10.2337/db08-0987.

Duvic, M.; Talpur, R.; Ni, X.; Zhang, C.; Hazarika, P.; Kelly, C. et al. (2007): Phase 2 trial of oral vorinostat (suberoylanilide hydroxamic acid, SAHA) for refractory cutaneous T-cell lymphoma (CTCL). In: *Blood* 109 (1), S. 31–39. DOI: 10.1182/blood-2006-06-025999.

European Medicines Agency (Accessed 2015): Public summary of opinion on orphan designation: panobinostat for the treatment of multiple myeloma. 2015. Online verfügbar unter http://www.ema.europa.eu/docs/en_GB/document_library/Orphan_designation/2012/12/WC500136185.pdf.

Feng, J.; Funk, W. D.; Wang, S. S.; Weinrich, S. L.; Avilion, A. A.; Chiu, C. P. et al. (1995): The RNA component of human telomerase. In: *Science (New York, N.Y.)* 269 (5228), S. 1236–1241.

Feng, L.; Lin, T.; Uranishi, H.; Gu, W.; Xu, Y. (2005): Functional analysis of the roles of posttranslational modifications at the p53 C terminus in regulating p53 stability and activity. In: *Molecular and cellular biology* 25 (13), S. 5389–5395. DOI: 10.1128/MCB.25.13.5389-5395.2005.

Finnin, M. S.; Donigian, J. R.; Cohen, A.; Richon, V. M.; Rifkind, R. A.; Marks, P. A. et al. (1999): Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors. In: *Nature* 401 (6749), S. 188–193. DOI: 10.1038/43710.

Fischle, W.; Kiermer, V.; Dequiedt, F.; Verdin, E. (2001): The emerging role of class II histone deacetylases. In: *Biochemistry and cell biology = Biochimie et biologie cellulaire* 79 (3), S. 337–348.

Fournel, M.; Bonfils, C.; Hou, Y.; Yan, P. T.; Trachy-Bourget, M.-C. Kalita, A. et al. (2008): MGCD0103, a novel isotype-selective histone deacetylase inhibitor, has broad spectrum antitumor activity in vitro and in vivo. In: *Molecular cancer therapeutics* 7 (4), S. 759–768. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-07-2026.

Franci, G.; Casalino, L.; Petraglia, F.; Miceli, M.; Menafrà, R.; Radic, B. et al. (2013): The class I-specific HDAC inhibitor MS-275 modulates the differentiation potential of mouse embryonic stem cells. In: *Biology open* 2 (10), S. 1070–1077. DOI: 10.1242/bio.20135587.

Furukawa, S.; Kuwajima, Y.; Chosa, N.; Satoh, K.; Ohtsuka, M.; Miura, H. et al. (2015): Establishment of immortalized mesenchymal stem cells derived from the submandibular glands of tdTomato transgenic mice. In: *Experimental and therapeutic medicine* 10 (4), S. 1380–1386. DOI: 10.3892/etm.2015.2700.

Gao, L.; Cueto, M. A.; Asselbergs, F.; Atadja, P. (2002): Cloning and functional characterization of HDAC11, a novel member of the human histone deacetylase family. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (28), S. 25748–25755. DOI: 10.1074/jbc.M111871200.

Garnock-Jones, K.g P. (2015): Panobinostat: first global approval. In: *Drugs* 75 (6), S. 695–704. DOI: 10.1007/s40265-015-0388-8.

- Glaser, K. B.; Staver, M. J.; Waring, J. F.; Stender, J.; Ulrich, R. G.; Davidsen, S. K. (2003): Gene expression profiling of multiple histone deacetylase (HDAC) inhibitors: defining a common gene set produced by HDAC inhibition in T24 and MDA carcinoma cell lines. In: *Molecular cancer therapeutics* 2 (2), S. 151–163.
- Glaser, T.; Jepeal, L.; Edwards, J. G.; Young, S. R.; Favor, J.; Maas, R. L. (1994): PAX6 gene dosage effect in a family with congenital cataracts, aniridia, anophthalmia and central nervous system defects. In: *Nature genetics* 7 (4), S. 463–471. DOI: 10.1038/ng0894-463.
- Grassadonia, A.; Cioffi, P.; Simiele, F.; Iezzi, L.; Zilli, M.; Natoli, C. (2013): Role of Hydroxamate-Based Histone Deacetylase Inhibitors (Hb-HDACIs) in the Treatment of Solid Malignancies. In: *Cancers* 5 (3), S. 919–942. DOI: 10.3390/cancers5030919.
- Gregoretta, I. V.; Lee, Y.-M.; Goodson, H. V. (2004): Molecular evolution of the histone deacetylase family: functional implications of phylogenetic analysis. In: *Journal of molecular biology* 338 (1), S. 17–31. DOI: 10.1016/j.jmb.2004.02.006.
- Greider, C. W.; Blackburn, E. H. (1985): Identification of a specific telomere terminal transferase activity in Tetrahymena extracts. In: *Cell* 43 (2 Pt 1), S. 405–413.
- Guha, M. (2015): HDAC inhibitors still need a home run, despite recent approval. In: *Nature reviews. Drug discovery* 14 (4), S. 225–226. DOI: 10.1038/nrd4583.
- Guo, T.; Wang, W.; Zhang, H.; Liu, Y.; Chen, P.; Ma, K.; Zhou, C. (2011): ISL1 promotes pancreatic islet cell proliferation. In: *PloS one* 6 (8), S. e22387. DOI: 10.1371/journal.pone.0022387.
- Harley, C. B.; Futcher, A. B.; Greider, C. W. (1990): Telomeres shorten during ageing of human fibroblasts. In: *Nature* 345 (6274), S. 458–460. DOI: 10.1038/345458a0.
- Haumaitre, C.; Lenoir, O.; Scharfmann, R. (2008): Histone deacetylase inhibitors modify pancreatic cell fate determination and amplify endocrine progenitors. In: *Molecular and cellular biology* 28 (20), S. 6373–6383. DOI: 10.1128/MCB.00413-08.
- Haumaitre, C.; Lenoir, O.; Scharfmann, R. (2009): Directing cell differentiation with small-molecule histone deacetylase inhibitors: the example of promoting pancreatic endocrine cells. In: *Cell cycle (Georgetown, Tex.)* 8 (4), S. 536–544.
- Hayflick, L. (2007): Biological aging is no longer an unsolved problem. In: *Annals of the New York Academy of Sciences* 1100, S. 1–13. DOI: 10.1196/annals.1395.001.
- HAYFLICK, L. (1965): THE LIMITED IN VITRO LIFETIME OF HUMAN DIPLOID CELL STRAINS. In: *Experimental cell research* 37, S. 614–636.
- Haynesworth, S. E.; Baber, M. A.; Caplan, A. I. (1992a): Cell surface antigens on human marrow-derived mesenchymal cells are detected by monoclonal antibodies. In: *Bone* 13 (1), S. 69–80.
- Haynesworth, S. E.; Goshima, J.; Goldberg, V. M.; Caplan, A. I. (1992b): Characterization of cells with osteogenic potential from human marrow. In: *Bone* 13 (1), S. 81–88.
- Heidemann, C.; Du, Y.; Schubert, I.; Rathmann, W.; Scheidt-Nave, C. (2013): Prevalence and temporal trend of known diabetes mellitus: results of the German Health Interview and Examination Survey for Adults (DEGS1). In: *Bundesgesundheitsblatt, Gesundheitsforschung, Gesundheitsschutz* 56 (5-6), S. 668–677. DOI: 10.1007/s00103-012-1662-5.

- Henrici, A.; Montalbano, R.; Neureiter, D.; Krause, M.; Stiewe, T.; Slater, E. P. et al. (2015): The pan-deacetylase inhibitor panobinostat suppresses the expression of oncogenic miRNAs in hepatocellular carcinoma cell lines. In: *Molecular carcinogenesis* 54 (8), S. 585–597. DOI: 10.1002/mc.22122.
- Hergeth, S. P.; Schneider, R. (2015): The H1 linker histones: multifunctional proteins beyond the nucleosomal core particle. In: *EMBO reports* 16 (11), S. 1439–1453. DOI: 10.15252/embr.201540749.
- Hess-Stumpp, H.; Bracker, T. U.; Henderson, D.; Politz, O. (2007): MS-275, a potent orally available inhibitor of histone deacetylases--the development of an anticancer agent. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 39 (7-8), S. 1388–1405. DOI: 10.1016/j.biocel.2007.02.009.
- Hildmann, C.; Wegener, D.; Riester, D.; Hempel, R.; Schober, A.; Merana, J. et al. (2006): Substrate and inhibitor specificity of class 1 and class 2 histone deacetylases. In: *Journal of Biotechnology* 124 (1), S. 258–270. DOI: 10.1016/j.jbiotec.2006.01.030.
- Hoffend, N. C.; Magner, W. J.; Tomasi, T. B. (2017): The epigenetic regulation of Dicer and microRNA biogenesis by Panobinostat. In: *Epigenetics* 12 (2), S. 105–112. DOI: 10.1080/15592294.2016.1267886.
- Hu, E.; Dul, E.; Sung, C.-M.; Chen, Z.; Kirkpatrick, R.; Zhang, G.-F. et al. (2003): Identification of novel isoform-selective inhibitors within class I histone deacetylases. In: *The Journal of pharmacology and experimental therapeutics* 307 (2), S. 720–728. DOI: 10.1124/jpet.103.055541.
- Huang, H. P.; Liu, M.; El-Hodiri, H. M.; Chu, K.; Jamrich, M.; Tsai, M. J. (2000): Regulation of the pancreatic islet-specific gene BETA2 (neuroD) by neurogenin 3. In: *Molecular and cellular biology* 20 (9), S. 3292–3307.
- Huffman, K. E.; Levene, S. D.; Tesmer, V. M.; Shay, J. W.; Wright, W. E. (2000): Telomere shortening is proportional to the size of the G-rich telomeric 3'-overhang. In: *The Journal of biological chemistry* 275 (26), S. 19719–19722. DOI: 10.1074/jbc.M002843200.
- I. M.; Kammer, G. M. (2001): Trichostatin A reverses skewed expression of CD154, interleukin-10, and interferon-gamma gene and protein expression in lupus T cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 98 (5), S. 2628–2633. DOI: 10.1073/pnas.051507098.
- International Diabetes Federation (2015): IDF Diabetes Atlas, 7th edn. Update 2015 Brussels, Belgium,. Online verfügbar unter <http://www.diabetesatlas.org/>, zuletzt aktualisiert am 2015.
- Izadpanah, R.; Trygg, C.; Patel, B.; Kriedt, C.; Dufour, J.; Gimble, J. M.; Bunnell, B. A. (2006): Biologic properties of mesenchymal stem cells derived from bone marrow and adipose tissue. In: *Journal of cellular biochemistry* 99 (5), S. 1285–1297. DOI: 10.1002/jcb.20904.
- Jennings, R. E.; Berry, A. A.; Kirkwood-Wilson, R.; Roberts, N. A.; Hearn, T.; Salisbury, R. J. et al. (2013): Development of the human pancreas from foregut to endocrine commitment. In: *Diabetes* 62 (10), S. 3514–3522. DOI: 10.2337/db12-1479.
- Jiang, Y.; Jahagirdar, B. N.; Reinhardt, R. L.; Schwartz, R. E.; Keene, C. D.; Ortiz-Gonzalez, X. R. et al. (2002): Pluripotency of mesenchymal stem cells derived from adult marrow. In: *Nature* 418 (6893), S. 41–49. DOI: 10.1038/nature00870.

- Joglekar, M. V.; Joglekar, V. M.; Hardikar, A. A. (2009): Expression of islet-specific microRNAs during human pancreatic development. In: *Gene expression patterns : GEP* 9 (2), S. 109–113. DOI: 10.1016/j.gep.2008.10.001.
- Kadmas, J. L.; Beckerle, M. C. (2004): The LIM domain: from the cytoskeleton to the nucleus. In: *Nature reviews. Molecular cell biology* 5 (11), S. 920–931. DOI: 10.1038/nrm1499.
- Karantzali, E.; Schulz, H.; Hummel, O.; Hubner, N.; Hatzopoulos, A.; Kretsovali, A. (2008): Histone deacetylase inhibition accelerates the early events of stem cell differentiation: transcriptomic and epigenetic analysis. In: *Genome biology* 9 (4), S. R65. DOI: 10.1186/gb-2008-9-4-r65.
- Karlsson, O.; Thor, S.; Norberg, T.; Ohlsson, H.; Edlund, T. (1990): Insulin gene enhancer binding protein Isl-1 is a member of a novel class of proteins containing both a homeo- and a Cys-His domain. In: *Nature* 344 (6269), S. 879–882. DOI: 10.1038/344879a0.
- Kern, S.; Eichler, H.; Stoeve, J.; Kluter, H.; Bieback, K. (2006): Comparative analysis of mesenchymal stem cells from bone marrow, umbilical cord blood, or adipose tissue. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 24 (5), S. 1294–1301. DOI: 10.1634/stemcells.2005-0342.
- Kim, N. W.; Piatyszek, M. A.; Prowse, K. R.; Harley, C. B.; West, M. D.; Ho, P. L. et al. (1994): Specific association of human telomerase activity with immortal cells and cancer. In: *Science (New York, N.Y.)* 266 (5193), S. 2011–2015.
- Kim, S.-H.; Jeong, J.-W.; Park, J. A.; Lee, J.-W.; Seo, J. H.; Jung, B.-K. et al. (2007): Regulation of the HIF-1alpha stability by histone deacetylases. In: *Oncology reports* 17 (3), S. 647–651.
- Klein, D.; Misawa, R.; Bravo-Egana, V.; Vargas, N.; Rosero, S.; Piroso, J. et al. (2013): MicroRNA expression in alpha and beta cells of human pancreatic islets. In: *PloS one* 8 (1), S. e55064. DOI: 10.1371/journal.pone.0055064.
- Kurihara, Y.; Suzuki, T.; Sakaue, M.; Murayama, O.; Miyazaki, Y.; Onuki, A. et al. (2014): Valproic acid, a histone deacetylase inhibitor, decreases proliferation of and induces specific neurogenic differentiation of canine adipose tissue-derived stem cells. In: *The Journal of veterinary medical science / the Japanese Society of Veterinary Science* 76 (1), S. 15–23.
- Lee, J. E.; Hollenberg, S. M.; Snider, L.; Turner, D. L.; Lipnick, N.; Weintraub, H. (1995): Conversion of *Xenopus* ectoderm into neurons by NeuroD, a basic helix-loop-helix protein. In: *Science (New York, N.Y.)* 268 (5212), S. 836–844.
- Lee, J.-H.; Park, J.-H.; Jung, Y.; Kim, J.-H.; Jong, H.-S.; Kim, T.-Y.; Bang, Y.-J. (2006): Histone deacetylase inhibitor enhances 5-fluorouracil cytotoxicity by down-regulating thymidylate synthase in human cancer cells. In: *Molecular cancer therapeutics* 5 (12), S. 3085–3095. DOI: 10.1158/1535-7163.MCT-06-0419.
- Lee, S.-C.; Cheong, H.-J.; Kim, S.-J.; Yoon, J.; Kim, H. J.; Kim, K. H. et al. (2011): Low-dose combinations of LBH589 and TRAIL can overcome TRAIL-resistance in colon cancer cell lines. In: *Anticancer research* 31 (10), S. 3385–3394.
- Lenoir, O.; Flosseau, K.; Ma, F. X.; Blondeau, B.; Mai, A.; Bassel-Duby, R. et al. (2011): Specific control of pancreatic endocrine beta- and delta-cell mass by class IIa histone deacetylases HDAC4, HDAC5, and HDAC9. In: *Diabetes* 60 (11), S. 2861–2871. DOI: 10.2337/db11-0440.
- Leoni, F.; Zaliani, A.; Bertolini, G.; Porro, G.; Pagani, P.; Pozzi, P. et al. (2002): The

antitumor histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid exhibits antiinflammatory properties via suppression of cytokines. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 99 (5), S. 2995–3000. DOI: 10.1073/pnas.052702999.

Lewis, B. P.; Burge, C. B.; Bartel, D. P. (2005): Conserved seed pairing, often flanked by adenosines, indicates that thousands of human genes are microRNA targets. In: *Cell* 120 (1), S. 15–20. DOI: 10.1016/j.cell.2004.12.035.

Li, J.; Zhu, L.; Qu, X.; Lin, R.; Liao, L.; Wang, J. et al. (2013): Stepwise differentiation of human adipose-derived mesenchymal stem cells toward definitive endoderm and pancreatic progenitor cells by mimicking pancreatic development in vivo. In: *Stem cells and development* 22 (10), S. 1576–1587. DOI: 10.1089/scd.2012.0148.

Li, J.; Goodyer, C. G.; Fellows, F.; Wang, R. (2006): Stem cell factor/c-Kit interactions regulate human islet-epithelial cluster proliferation and differentiation. In: *The international journal of biochemistry & cell biology* 38 (5-6), S. 961–972. DOI: 10.1016/j.biocel.2005.08.014.

Li, J.; Quirt, J.; Do, H. Q.; Lyte, K.; Fellows, F.; Goodyer, C. G.; Wang, R. (2007): Expression of c-Kit receptor tyrosine kinase and effect on beta-cell development in the human fetal pancreas. In: *American journal of physiology. Endocrinology and metabolism* 293 (2), S. E475-83. DOI: 10.1152/ajpendo.00172.2007.

Li, L.; Lili, R.; Hui, Q.; Min, W.; Xue, W.; Xin, S. et al. (2008): Combination of GLP-1 and sodium butyrate promote differentiation of pancreatic progenitor cells into insulin-producing cells. In: *Tissue & cell* 40 (6), S. 437–445. DOI: 10.1016/j.tice.2008.04.006.

Li, M.; Luo, J.; Brooks, C. L.; Gu, W. (2002): Acetylation of p53 inhibits its ubiquitination by Mdm2. In: *The Journal of biological chemistry* 277 (52), S. 50607–50611. DOI: 10.1074/jbc.C200578200.

Li, Y.; Woster, P. M. (2015): Discovery of a new class of histone deacetylase inhibitors with a novel zinc binding group. In: *MedChemComm* 6 (4), S. 613–618. DOI: 10.1039/C4MD00401A.

Liu, R.; Chang, W.; Wei, H.; Zhang, K. (2016): Comparison of the Biological Characteristics of Mesenchymal Stem Cells Derived from Bone Marrow and Skin. In: *Stem cells international* 2016, S. 3658798. DOI: 10.1155/2016/3658798.

Lobera, M.; Madauss, K. P.; Pohlhaus, D. T.; Wright, Q. G.; Trocha, M.; Schmidt, D. R. et al. (2013): Selective class IIa histone deacetylase inhibition via a nonchelating zinc-binding group. In: *Nature chemical biology* 9 (5), S. 319–325. DOI: 10.1038/nchembio.1223.

Lüllmann-Rauch, R. (2012): Taschenlehrbuch Histologie. 4., vollst. überarb. Aufl. Stuttgart: Thieme.

Lyttle, B. M.; Li, J.; Krishnamurthy, M.; Fellows, F.; Wheeler, M. B.; Goodyer, C. G.; Wang, R. (2008): Transcription factor expression in the developing human fetal endocrine pancreas. In: *Diabetologia* 51 (7), S. 1169–1180. DOI: 10.1007/s00125-008-1006-z.

Mai, A.; Massa, S.; Pezzi, R.; Simeoni, S.; Rotili, D.; Nebbioso, A. et al. (2005): Class II (IIa)-selective histone deacetylase inhibitors. 1. Synthesis and biological evaluation of novel (aryloxopropenyl)pyrrolyl hydroxyamides. In: *Journal of medicinal chemistry* 48 (9), S. 3344–3353. DOI: 10.1021/jm049002a.

Manal, M.; Chandrasekar, M. J. N.; Gomathi Priya, J.; Nanjan, M. J. (2016): Inhibitors

of histone deacetylase as antitumor agents: A critical review. In: *Bioorganic chemistry* 67, S. 18–42. DOI: 10.1016/j.bioorg.2016.05.005.

Mansouri, A.; Hallonet, M.; Gruss, P. (1996): Pax genes and their roles in cell differentiation and development. In: *Current Opinion in Cell Biology* 8 (6), S. 851–857. DOI: 10.1016/S0955-0674(96)80087-1.

Marappagounder, D.; Somasundaram, I.; Dorairaj, S.; Sankaran, R. J. (2013): Differentiation of mesenchymal stem cells derived from human bone marrow and subcutaneous adipose tissue into pancreatic islet-like clusters in vitro. In: *Cellular & molecular biology letters* 18 (1), S. 75–88. DOI: 10.2478/s11658-012-0040-5.

Marinis, F. d.; Atmaca, A.; Tiseo, M.; Giuffreda, L.; Rossi, A.; Gebbia, V. et al. (2013): A phase II study of the histone deacetylase inhibitor panobinostat (LBH589) in pretreated patients with small-cell lung cancer. In: *Journal of thoracic oncology : official publication of the International Association for the Study of Lung Cancer* 8 (8), S. 1091–1094. DOI: 10.1097/JTO.0b013e318293d88c.

Marsich, E.; Vetere, A.; Di Piazza, M.; Tell, G.; Paoletti, S. (2003): The PAX6 gene is activated by the basic helix-loop-helix transcription factor NeuroD/BETA2. In: *The Biochemical journal* 376 (Pt 3), S. 707–715. DOI: 10.1042/BJ20031021.

Martin, M.; Kettmann, R.; Dequiedt, F. (2007): Class IIa histone deacetylases: regulating the regulators. In: *Oncogene* 26 (37), S. 5450–5467. DOI: 10.1038/sj.onc.1210613.

Martin, M.; Kettmann, R.; Dequiedt, F. (2009): Class IIa histone deacetylases: conducting development and differentiation. In: *The International journal of developmental biology* 53 (2-3), S. 291–301. DOI: 10.1387/ijdb.082698mm.

Matsuda, Y.; Yamauchi, T.; Hosono, N.; Uzui, K.; Negoro, E.; Morinaga, K. et al. (2016): Combination of panobinostat with ponatinib synergistically overcomes imatinib-resistant CML cells. In: *Cancer science* 107 (7), S. 1029–1038. DOI: 10.1111/cas.12965.

Mishra, P. J.; Mishra, P. J.; Glod, J. W.; Banerjee, D. (2009): Mesenchymal stem cells: flip side of the coin. In: *Cancer research* 69 (4), S. 1255–1258. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-3562.

Mitsiades, C. S.; Mitsiades, N. S.; McMullan, C. J.; Poulaki, V.; Shringarpure, R.; Hideshima, T. et al. (2004): Transcriptional signature of histone deacetylase inhibition in multiple myeloma: biological and clinical implications. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 101 (2), S. 540–545. DOI: 10.1073/pnas.2536759100.

Morigi, M.; Introna, M.; Imberti, B.; Corna, D.; Abbate, M.; Rota, C. et al. (2008): Human bone marrow mesenchymal stem cells accelerate recovery of acute renal injury and prolong survival in mice. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 26 (8), S. 2075–2082. DOI: 10.1634/stemcells.2007-0795.

Morin, G. B. (1989): The human telomere terminal transferase enzyme is a ribonucleoprotein that synthesizes TTAGGG repeats. In: *Cell* 59 (3), S. 521–529.

Moyzis, R. K.; Buckingham, J. M.; Cram, L. S.; Dani, M.; Deaven, L. L.; Jones, M. D. et al. (1988): A highly conserved repetitive DNA sequence, (TTAGGG)_n, present at the telomeres of human chromosomes. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 85 (18), S. 6622–6626.

Najar, M.; Raicevic, G.; Andre, T.; Fayyad-Kazan, H.; Pieters, K.; Bron, D. et al. (2016): Mesenchymal stromal cells from the foreskin: Tissue isolation, cell characterization and

- immunobiological properties. In: *Cytotherapy* 18 (3), S. 320–335. DOI: 10.1016/j.jcyt.2015.11.013.
- Naya, F. J.; Huang, H. P.; Qiu, Y.; Mutoh, H.; DeMayo, F. J.; Leiter, A. B.; Tsai, M. J. (1997): Diabetes, defective pancreatic morphogenesis, and abnormal enteroendocrine differentiation in BETA2/neuroD-deficient mice. In: *Genes & Development* 11 (18), S. 2323–2334.
- Naya, F. J.; Stellrecht, C. M.; Tsai, M. J. (1995): Tissue-specific regulation of the insulin gene by a novel basic helix-loop-helix transcription factor. In: *Genes & Development* 9 (8), S. 1009–1019.
- Nebbioso, A.; Carafa, V.; Benedetti, R.; Altucci, L. (2012): Trials with 'epigenetic' drugs: an update. In: *Molecular oncology* 6 (6), S. 657–682. DOI: 10.1016/j.molonc.2012.09.004.
- Nebbioso, A.; Clarke, N.; Voltz, E.; Germain, E.; Ambrosino, C.; Bontempo, P. et al. (2005): Tumor-selective action of HDAC inhibitors involves TRAIL induction in acute myeloid leukemia cells. In: *Nature medicine* 11 (1), S. 77–84. DOI: 10.1038/nm1161.
- Nebbioso, A.; Manzo, F.; Miceli, M.; Conte, M.; Manente, L.; Baldi, A. et al. (2009): Selective class II HDAC inhibitors impair myogenesis by modulating the stability and activity of HDAC-MEF2 complexes. In: *EMBO reports* 10 (7), S. 776–782. DOI: 10.1038/embor.2009.88.
- Nieto, M.; Hevia, P.; Garcia, E.; Klein, D.; Alvarez-Cubela, S.; Bravo-Egana, V. et al. (2012): Antisense miR-7 impairs insulin expression in developing pancreas and in cultured pancreatic buds. In: *Cell transplantation* 21 (8), S. 1761–1774. DOI: 10.3727/096368911X612521.
- Nishimori, M.; Yamada, Y.; Hoshi, K.; Akiyama, Y.; Hoshi, Y.; Morishima, Y. et al. (2002): Health-related quality of life of unrelated bone marrow donors in Japan. In: *Blood* 99 (6), S. 1995–2001.
- Novartis (2015): Novartis receives EU approval for Farydak®, the first in its class of anticancer agents approved for patients with multiple myeloma (media release). Online verfügbar unter <https://www.novartis.com/news/media-releases/novartis-receives-eu-approval-farydak%C2%AE-first-its-class-anticancer-agents>.
- O'Rahilly, R.; Muller, F. (2010): Developmental stages in human embryos: revised and new measurements. In: *Cells, tissues, organs* 192 (2), S. 73–84. DOI: 10.1159/000289817.
- Orlic, D.; Kajstura, J.; Chimenti, S.; Bodine, D. M.; Leri, A.; Anversa, P. (2003): Bone marrow stem cells regenerate infarcted myocardium. In: *Pediatric transplantation* 7 Suppl 3, S. 86–88.
- Osaka, M.; Honmou, O.; Murakami, T.; Nonaka, T.; Houkin, K.; Hamada, Hirofumi; K., Jeffery D. (2010): Intravenous administration of mesenchymal stem cells derived from bone marrow after contusive spinal cord injury improves functional outcome. In: *Brain research* 1343, S. 226–235. DOI: 10.1016/j.brainres.2010.05.011.
- Pagliuca, F. W.; Millman, J. R.; Gurtler, M.; Segel, M.; van Dervort, A.; Ryu, J. H. et al. (2014): Generation of functional human pancreatic beta cells in vitro. In: *Cell* 159 (2), S. 428–439. DOI: 10.1016/j.cell.2014.09.040.
- Papadimou, E.; Morigi, M.; Iatropoulos, P.; Xinaris, C.; Tomasoni, S.; Benedetti, V. et al. (2015): Direct reprogramming of human bone marrow stromal cells into functional renal

cells using cell-free extracts. In: *Stem cell reports* 4 (4), S. 685–698. DOI: 10.1016/j.stemcr.2015.02.002.

Park, J. H.; Stoffers, D. A.; Nicholls, R. D.; Simmons, R. A. (2008): Development of type 2 diabetes following intrauterine growth retardation in rats is associated with progressive epigenetic silencing of Pdx1. In: *The Journal of clinical investigation* 118 (6), S. 2316–2324. DOI: 10.1172/JCI33655.

Peart, M. J.; Smyth, G. K.; van Laar, R. K.; Bowtell, D. D.; Richon, V. M.; Marks, P. A. et al. (2005): Identification and functional significance of genes regulated by structurally different histone deacetylase inhibitors. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (10), S. 3697–3702. DOI: 10.1073/pnas.0500369102.

Pfaff, S. L.; Mendelsohn, M.; Stewart, C. L.; Edlund, T.; Jessell, T. M. (1996): Requirement for LIM homeobox gene *Isl1* in motor neuron generation reveals a motor neuron-dependent step in interneuron differentiation. In: *Cell* 84 (2), S. 309–320.

Pictet, R. L.; Clark, W. R.; Williams, R. H.; Rutter, W. J. (1972): An ultrastructural analysis of the developing embryonic pancreas. In: *Developmental biology* 29 (4), S. 436–467.

Piper, K.; Brickwood, S.; Turnpenny, L. W.; Cameron, I. T.; Ball, S. G.; Wilson, D. I.; Hanley, N. A. (2004): Beta cell differentiation during early human pancreas development. In: *The Journal of endocrinology* 181 (1), S. 11–23.

Pittenger, M. F.; Mackay, A. M.; Beck, S. C.; Jaiswal, R. K.; Douglas, R.; Mosca, J. D. et al. (1999): Multilineage potential of adult human mesenchymal stem cells. In: *Science (New York, N.Y.)* 284 (5411), S. 143–147.

Qian, D. Z.; Kato, Y.; Shabbeer, S.; Wei, Y.; Verheul, H. M. W.; Salumbides, B. et al. (2006): Targeting tumor angiogenesis with histone deacetylase inhibitors: the hydroxamic acid derivative LBH589. In: *Clinical cancer research : an official journal of the American Association for Cancer Research* 12 (2), S. 634–642. DOI: 10.1158/1078-0432.CCR-05-1132.

Ragni, E.; Vigano, M.; Rebulli, P.; Giordano, R.; Lazzari, L. (2013): What is beyond a qRT-PCR study on mesenchymal stem cell differentiation properties: how to choose the most reliable housekeeping genes. In: *Journal of cellular and molecular medicine* 17 (1), S. 168–180. DOI: 10.1111/j.1582-4934.2012.01660.x.

Rall, L. B.; Pictet, R. L.; Rutter, W. J. (1979): Synthesis and accumulation of proinsulin and insulin during development of the embryonic rat pancreas. In: *Endocrinology* 105 (3), S. 835–841. DOI: 10.1210/endo-105-3-835.

Rall, L. B.; Pictet, R. L.; Williams, R. H.; Rutter, W. J. (1973): Early differentiation of glucagon-producing cells in embryonic pancreas: a possible developmental role for glucagon. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 70 (12), S. 3478–3482.

Rasheed, W. K.; Johnstone, R. W.; Prince, H. M. (2007): Histone deacetylase inhibitors in cancer therapy. In: *Expert opinion on investigational drugs* 16 (5), S. 659–678. DOI: 10.1517/13543784.16.5.659.

Rekittke, N. E.; Ang, M.; Rawat, D.; Khatri, R.; Linn, T. (2016): Regenerative Therapy of Type 1 Diabetes Mellitus: From Pancreatic Islet Transplantation to Mesenchymal Stem Cells. In: *Stem cells international* 2016, S. 3764681. DOI: 10.1155/2016/3764681.

Rezania, A.; Bruin, J. E.; Arora, P.; Rubin, A.; Batushansky, I.; Asadi, A. et al. (2014): Reversal of diabetes with insulin-producing cells derived in vitro from human pluripotent stem cells. In: *Nature biotechnology* 32 (11), S. 1121–1133. DOI: 10.1038/nbt.3033.

Rezania, A.; Bruin, J. E.; Riedel, M. J.; Mojibian, M.; Asadi, A.; Xu, J. et al. (2012): Maturation of human embryonic stem cell-derived pancreatic progenitors into functional islets capable of treating pre-existing diabetes in mice. In: *Diabetes* 61 (8), S. 2016–2029. DOI: 10.2337/db11-1711.

Rezania, A.; Bruin, J. E.; Xu, J.; Narayan, K.; Fox, J. K.; O'Neil, J. J.; Kieffer, T. J. (2013): Enrichment of human embryonic stem cell-derived NKX6.1-expressing pancreatic progenitor cells accelerates the maturation of insulin-secreting cells in vivo. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 31 (11), S. 2432–2442. DOI: 10.1002/stem.1489.

Richon, V. M.; Sandhoff, T. W.; Rifkind, R. A.; Marks, P. A. (2000): Histone deacetylase inhibitor selectively induces p21WAF1 expression and gene-associated histone acetylation. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 97 (18), S. 10014–10019. DOI: 10.1073/pnas.180316197.

Rosato, R. R.; Almenara, J. A.; Grant, S. (2003): The histone deacetylase inhibitor MS-275 promotes differentiation or apoptosis in human leukemia cells through a process regulated by generation of reactive oxygen species and induction of p21CIP1/WAF1 1. In: *Cancer research* 63 (13), S. 3637–3645.

Rosland, G. V.; Svendsen, A.; Torsvik, A.; Sobala, E.; McCormack, E.; Immervoll, H. et al. (2009): Long-term cultures of bone marrow-derived human mesenchymal stem cells frequently undergo spontaneous malignant transformation. In: *Cancer research* 69 (13), S. 5331–5339. DOI: 10.1158/0008-5472.CAN-08-4630.

Rubio, D.; Garcia, S.; La Cueva, T. d.; Paz, M. F.; Lloyd, A. C.; Bernad, A.; Garcia-Castro, J. (2008): Human mesenchymal stem cell transformation is associated with a mesenchymal-epithelial transition. In: *Experimental cell research* 314 (4), S. 691–698. DOI: 10.1016/j.yexcr.2007.11.017.

Saito, A.; Yamashita, T.; Mariko, Y.; Nosaka, Y.; Tsuchiya, K.; Ando, T. et al. (1999): A synthetic inhibitor of histone deacetylase, MS-27-275, with marked in vivo antitumor activity against human tumors. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 96 (8), S. 4592–4597.

Salmon, J. M.; Bots, M.; Vidacs, E.; Stanley, K. L.; Atadja, P.; Zuber, J.; Johnstone, R. W. (2015): Combining the differentiating effect of panobinostat with the apoptotic effect of arsenic trioxide leads to significant survival benefit in a model of t(8;21) acute myeloid leukemia. In: *Clinical epigenetics* 7 (1), S. 2. DOI: 10.1186/s13148-014-0034-4.

Sander, M.; Neubuser, A.; Kalamaras, J.; Ee, H. C.; Martin, G. R.; German, M. S. (1997): Genetic analysis reveals that PAX6 is required for normal transcription of pancreatic hormone genes and islet development. In: *Genes & Development* 11 (13), S. 1662–1673. DOI: 10.1101/gad.11.13.1662.

San-Miguel, J. F.; Hungria, V. T. M.; Yoon, S.-S.; Beksac, M.; Dimopoulos, M. A.; Elghandour, As. et al. (2014): Panobinostat plus bortezomib and dexamethasone versus placebo plus bortezomib and dexamethasone in patients with relapsed or relapsed and refractory multiple myeloma: a multicentre, randomised, double-blind phase 3 trial. In: *The Lancet. Oncology* 15 (11), S. 1195–1206. DOI: 10.1016/S1470-2045(14)70440-1.

Schindler, K. (2013): Untersuchung zur Wirkung von Valproinsäure auf Histon-

Modifikation und den Transkriptionsfaktor PDX-1 bei Panc-1- Zellen, 06/2013, Bachelorarbeit aus dem Forschungslabor Prof Linn, Med Klinik und Poliklinik II, Universitätsklinikum Gießen und Marburg, Standort Gießen.

Schisler, J. C.; Jensen, P. B.; Taylor, D. G.; Becker, T. C.; Knop, F. K.; Takekawa, S. et al. (2005): The Nkx6.1 homeodomain transcription factor suppresses glucagon expression and regulates glucose-stimulated insulin secretion in islet beta cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 102 (20), S. 7297–7302. DOI: 10.1073/pnas.0502168102.

Schulz, T. C.; Young, H. Y.; Agulnick, A. D.; Babin, M. J.; Baetge, E. E.; Bang, A. G. et al. (2012): A scalable system for production of functional pancreatic progenitors from human embryonic stem cells. In: *PloS one* 7 (5), S. e37004. DOI: 10.1371/journal.pone.0037004.

Schwartz, R. E.; Reyes, M.; Koodie, L.; Jiang, Y.; Blackstad, M.; Lund, T. et al. (2002): Multipotent adult progenitor cells from bone marrow differentiate into functional hepatocyte-like cells. In: *The Journal of clinical investigation* 109 (10), S. 1291–1302. DOI: 10.1172/JCI15182.

Scuto, A.; Kirschbaum, M.; Kowolik, C.; Kretzner, L.; Juhasz, A.; Atadja, P. et al. (2008): The novel histone deacetylase inhibitor, LBH589, induces expression of DNA damage response genes and apoptosis in Ph- acute lymphoblastic leukemia cells. In: *Blood* 111 (10), S. 5093–5100. DOI: 10.1182/blood-2007-10-117762.

Seeberger, K. L.; Dufour, J. M.; Shapiro, A. M. James; Lakey, J. R. T.; Rajotte, R. V.; Korbitt, G. S. (2006): Expansion of mesenchymal stem cells from human pancreatic ductal epithelium. In: *Laboratory investigation; a journal of technical methods and pathology* 86 (2), S. 141–153. DOI: 10.1038/labinvest.3700377.

Sepulveda, J. C.; Tome, M.; Fernandez, M. E.; Delgado, M.; Campisi, J.; Bernad, A.; Gonzalez, M. A. (2014): Cell senescence abrogates the therapeutic potential of human mesenchymal stem cells in the lethal endotoxemia model. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 32 (7), S. 1865–1877. DOI: 10.1002/stem.1654.

Sethe, S.; Scutt, A.; Stolzing, A. (2006): Aging of mesenchymal stem cells. In: *Ageing research reviews* 5 (1), S. 91–116. DOI: 10.1016/j.arr.2005.10.001.

Shao, W.; Growney, J. D.; Feng, Y.; O'Connor, G.; Pu, M.; Zhu, W. et al. (2010): Activity of deacetylase inhibitor panobinostat (LBH589) in cutaneous T-cell lymphoma models: Defining molecular mechanisms of resistance. In: *International journal of cancer* 127 (9), S. 2199–2208. DOI: 10.1002/ijc.25218.

Shapiro, A. M. J.; Ricordi, C.; Hering, B. J.; Auchincloss, H.; Lindblad, R.; Robertson, R. P. et al. (2006): International trial of the Edmonton protocol for islet transplantation. In: *The New England journal of medicine* 355 (13), S. 1318–1330. DOI: 10.1056/NEJMoa061267.

Shay, J. W.; Bacchetti, S. (1997): A survey of telomerase activity in human cancer. In: *European journal of cancer (Oxford, England : 1990)* 33 (5), S. 787–791. DOI: 10.1016/S0959-8049(97)00062-2.

Simoes-Pires, C. A.; Bertrand, P.; Cuendet, M. (2017): Novel histone deacetylase 6 (HDAC6) selective inhibitors: a patent evaluation (WO2014181137). In: *Expert opinion on therapeutic patents* 27 (3), S. 229–236. DOI: 10.1080/13543776.2017.1282945.

Simonsen, J. L.; Rosada, C.; Serakinci, N.; Justesen, J.; Stenderup, K.; Rattan, S. I. S. et

- al. (2002): Telomerase expression extends the proliferative life-span and maintains the osteogenic potential of human bone marrow stromal cells. In: *Nature biotechnology* 20 (6), S. 592–596. DOI: 10.1038/nbt0602-592.
- Sluijter, J. P. G.; van Mil, A.; van Vliet, P.; Metz, C. H. G.; Liu, J.; Doevendans, P. A.; Goumans, M.-J. (2010): MicroRNA-1 and -499 regulate differentiation and proliferation in human-derived cardiomyocyte progenitor cells. In: *Arteriosclerosis, thrombosis, and vascular biology* 30 (4), S. 859–868. DOI: 10.1161/ATVBAHA.109.197434.
- Stamm, C.; Westphal, B.; Kleine, H.-D.; Petzsch, M.; Kittner, C.; Klinge, H. et al. (2003): Autologous bone-marrow stem-cell transplantation for myocardial regeneration. In: *Lancet (London, England)* 361 (9351), S. 45–46. DOI: 10.1016/S0140-6736(03)12110-1.
- St-Onge, L.; Sosa-Pineda, B.; Chowdhury, K.; Mansouri, A.; Gruss, P. (1997): Pax6 is required for differentiation of glucagon-producing alpha-cells in mouse pancreas. In: *Nature* 387 (6631), S. 406–409. DOI: 10.1038/387406a0.
- Suzuki, A.; Nakauchi, H.; Taniguchi, H. (2003): Glucagon-like peptide 1 (1-37) converts intestinal epithelial cells into insulin-producing cells. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 100 (9), S. 5034–5039. DOI: 10.1073/pnas.0936260100.
- Suzuki, T.; Ando, T.; Tsuchiya, K.; Fukazawa, N.; Saito, A.; Mariko, Y. et al. (1999): Synthesis and histone deacetylase inhibitory activity of new benzamide derivatives. In: *Journal of medicinal chemistry* 42 (15), S. 3001–3003. DOI: 10.1021/jm980565u.
- Tang, D.-Q.; Wang, Q.; Burkhardt, B. R.; Litherland, S. A.; Atkinson, M. A.; Yang, L. (2012a): In vitro generation of functional insulin-producing cells from human bone marrow-derived stem cells, but long-term culture running risk of malignant transformation. In: *American journal of stem cells* 1 (2), S. 114–127.
- Tang, Y.; Cui, Y.-C.; Wang, X.-J.; Wu, A.-L.; Hu, G.-F.; Luo, F.-L. et al. (2012b): Neural progenitor cells derived from adult bone marrow mesenchymal stem cells promote neuronal regeneration. In: *Life sciences* 91 (19-20), S. 951–958. DOI: 10.1016/j.lfs.2012.09.005.
- Tarte, K.; Gaillard, J.; Lataillade, J.-J.; Fouillard, L.; Becker, M.; Mossafa, H. et al. (2010): Clinical-grade production of human mesenchymal stromal cells: occurrence of aneuploidy without transformation. In: *Blood* 115 (8), S. 1549–1553. DOI: 10.1182/blood-2009-05-219907.
- Taylor, B. L.; Liu, F.-F.; Sander, M. (2013): Nkx6.1 is essential for maintaining the functional state of pancreatic beta cells. In: *Cell reports* 4 (6), S. 1262–1275. DOI: 10.1016/j.celrep.2013.08.010.
- Thatava, T.; Ma, B.; Rohde, M.; Mayer, H. (2006): Chromatin-remodeling factors allow differentiation of bone marrow cells into insulin-producing cells. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 24 (12), S. 2858–2867. DOI: 10.1634/stemcells.2006-0109.
- Thomson, J. A.; Itskovitz-Eldor, J.; Shapiro, S. S.; Waknitz, M. A.; Swiergiel, J. J.; Marshall, V. S.; Jones, J. M. (1998): Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. In: *Science (New York, N.Y.)* 282 (5391), S. 1145–1147.
- Thor, S.; Ericson, J.; Brannstrom, T.; Edlund, T. (1991): The homeodomain LIM protein Isl-1 is expressed in subsets of neurons and endocrine cells in the adult rat. In: *Neuron* 7 (6), S. 881–889.

- Timper, K.; Seboek, D.; Eberhardt, M.; Linscheid, P.; Christ-Crain, M.; Keller, U. et al. (2006): Human adipose tissue-derived mesenchymal stem cells differentiate into insulin, somatostatin, and glucagon expressing cells. In: *Biochemical and biophysical research communications* 341 (4), S. 1135–1140. DOI: 10.1016/j.bbrc.2006.01.072.
- Tolar, J.; Nauta, A. J.; Osborn, M. J.; Panoskaltzis M., A.; McElmurry, R. T.; Bell, S. et al. (2007): Sarcoma derived from cultured mesenchymal stem cells. In: *Stem cells (Dayton, Ohio)* 25 (2), S. 371–379. DOI: 10.1634/stemcells.2005-0620.
- Torres, M.; Gómez-Pardo, E.; Dressler, G. R.; Gruss, P. (1995): Pax-2 controls multiple steps of urogenital development. In: *Development (Cambridge, England)* 121 (12), S. 4057–4065.
- Treisman, J.; Harris, E.; Desplan, C. (1991): The paired box encodes a second DNA-binding domain in the paired homeo domain protein. In: *Genes & Development* 5 (4), S. 594–604.
- Treisman, J.; Harris, E.; Wilson, D.; Desplan, C. (1992): The homeodomain: a new face for the helix-turn-helix? In: *BioEssays : news and reviews in molecular, cellular and developmental biology* 14 (3), S. 145–150. DOI: 10.1002/bies.950140302.
- Turinetto, V.; Vitale, E.; Giachino, C. (2016): Senescence in Human Mesenchymal Stem Cells: Functional Changes and Implications in Stem Cell-Based Therapy. In: *International journal of molecular sciences* 17 (7). DOI: 10.3390/ijms17071164.
- Turque, N.; Plaza, S.; Radvanyi, F.; Carriere, C.; Saule, S. (1994): Pax-QNR/Pax-6, a paired box- and homeobox-containing gene expressed in neurons, is also expressed in pancreatic endocrine cells. In: *Molecular endocrinology (Baltimore, Md.)* 8 (7), S. 929–938. DOI: 10.1210/mend.8.7.7984154.
- Uezumi, A.; Kasai, T.; Tsuchida, K. (2016): Identification, Isolation, and Characterization of Mesenchymal Progenitors in Mouse and Human Skeletal Muscle. In: *Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)* 1460, S. 241–253. DOI: 10.1007/978-1-4939-3810-0_17.
- Ugarte, D. A. d.; Morizono, K.; Elbarbary, A.; Alfonso, Z.; Zuk, P. A.; Zhu, M. et al. (2003): Comparison of multi-lineage cells from human adipose tissue and bone marrow. In: *Cells, tissues, organs* 174 (3), S. 101–109.
- Urbanek, P. (1994): Complete block of early B cell differentiation and altered patterning of the posterior midbrain in mice lacking Pax5/BSAP. In: *Cell* 79 (5), S. 901–912. DOI: 10.1016/0092-8674(94)90079-5.
- Vallstedt, A.; Muhr, J.; Pattyn, A.; Pierani, A.; Mendelsohn, M.; Sander, M. et al. (2001): Different levels of repressor activity assign redundant and specific roles to Nkx6 genes in motor neuron and interneuron specification. In: *Neuron* 31 (5), S. 743–755.
- van Lint, C.; Emiliani, S.; Verdin, E. (1996): The expression of a small fraction of cellular genes is changed in response to histone hyperacetylation. In: *Gene expression* 5 (4-5), S. 245–253.
- Verdin, E.; Dequiedt, F.; Kasler, H. G. (2003): Class II histone deacetylases. Versatile regulators. In: *Trends in Genetics* 19 (5), S. 286–293. DOI: 10.1016/S0168-9525(03)00073-8.
- Wagner, W.; Horn, P.; Castoldi, M.; Diehlmann, A.; Bork, S.; Saffrich, R. et al. (2008): Replicative senescence of mesenchymal stem cells: a continuous and organized process. In: *PloS one* 3 (5), S. e2213. DOI: 10.1371/journal.pone.0002213.

- Waldeck, K.; Cullinane, C.; Ardley, K.; Shortt, J.; Martin, B.; Tothill, R. W. et al. (2016): Long term, continuous exposure to panobinostat induces terminal differentiation and long term survival in the TH-MYCN neuroblastoma mouse model. In: *International journal of cancer* 139 (1), S. 194–204. DOI: 10.1002/ijc.30056.
- Wang, G.; Niu, X.a; Zhang, W.; Caldwell, J. T.; Edwards, H.; Chen, W. et al. (2015): Synergistic antitumor interactions between MK-1775 and panobinostat in preclinical models of pancreatic cancer. In: *Cancer letters* 356 (2 Pt B), S. 656–668. DOI: 10.1016/j.canlet.2014.10.015.
- Wang, Y.; Han, Z.-B.; Song, Y.-P.; Han, Z. C. (2012): Safety of mesenchymal stem cells for clinical application. In: *Stem cells international* 2012, S. 652034. DOI: 10.1155/2012/652034.
- Wang, Z.; Qin, G.; Zhao, T. C. (2014): HDAC4: mechanism of regulation and biological functions. In: *Epigenomics* 6 (1), S. 139–150. DOI: 10.2217/epi.13.73.
- WATSON, J. D.; CRICK, F. H. C. (1953): Molecular Structure of Nucleic Acids. A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. In: *Nature* 171 (4356), S. 737–738. DOI: 10.1038/171737a0.
- Watt, F. M.; Hogan, B. L. (2000): Out of Eden: stem cells and their niches. In: *Science (New York, N.Y.)* 287 (5457), S. 1427–1430.
- Wegener, D.; Wirsching, F.; Riester, D.; Schwienhorst, A. (2003): A fluorogenic histone deacetylase assay well suited for high-throughput activity screening. In: *Chemistry & biology* 10 (1), S. 61–68.
- West, A. C.; Johnstone, R. W. (2014): New and emerging HDAC inhibitors for cancer treatment. In: *The Journal of clinical investigation* 124 (1), S. 30–39. DOI: 10.1172/JCI69738.
- Wilm, B.; Dahl, E.; Peters, H.; Balling, R.; Imai, K. (1998): Targeted disruption of Pax1 defines its null phenotype and proves haploinsufficiency. In: *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America* 95 (15), S. 8692–8697.
- Wright, W. E.; Piatyszek, M. A.; Rainey, W. E.; Byrd, W.; Shay, J. W. (1996): Telomerase activity in human germline and embryonic tissues and cells. In: *Developmental genetics* 18 (2), S. 173–179. DOI: 10.1002/(SICI)1520-6408(1996)18:2<173::AID-DVG10>3.0.CO;2-3.
- Xiao, W.; Graham, P. H.; Hao, J.; Chang, L.; Ni, J.; Power, C. A. et al. (2013): Combination therapy with the histone deacetylase inhibitor LBH589 and radiation is an effective regimen for prostate cancer cells. In: *PloS one* 8 (8), S. e74253. DOI: 10.1371/journal.pone.0074253.
- Xu, W. S.; Parmigiani, R. B.; Marks, P. A. (2007): Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. In: *Oncogene* 26 (37), S. 5541–5552. DOI: 10.1038/sj.onc.1210620.
- Yang, X.-J.; Gregoire, S. (2005): Class II histone deacetylases: from sequence to function, regulation, and clinical implication. In: *Molecular and cellular biology* 25 (8), S. 2873–2884. DOI: 10.1128/MCB.25.8.2873-2884.2005.
- Yoo, E. J.; Chung, J.-J.; Choe, S. S.; Kim, K. H.; Kim, J. B. (2006): Down-regulation of Histone Deacetylases Stimulates Adipocyte Differentiation. In: *Journal of Biological Chemistry* 281 (10), S. 6608–6615. DOI: 10.1074/jbc.M508982200.

Yoshida, M.; Kijima, M.; Akita, M.; Beppu, T. (1990): Potent and specific inhibition of mammalian histone deacetylase both in vivo and in vitro by trichostatin A. In: *The Journal of biological chemistry* 265 (28), S. 17174–17179.

Zeng, L.; Zhou, M.-M. (2002): Bromodomain. An acetyl-lysine binding domain. In: *FEBS Letters* 513 (1), S. 124–128. DOI: 10.1016/S0014-5793(01)03309-9.

Zhang, T.; Cooper, S.; Brockdorff, N. (2015): The interplay of histone modifications - writers that read. In: *EMBO reports* 16 (11), S. 1467–1481. DOI: 10.15252/embr.201540945.

Zuk, P. A.; Zhu, M.; Mizuno, H.; Huang, J.; Futrell, J. W.; Katz, A. J. et al. (2001): Multilineage cells from human adipose tissue: implications for cell-based therapies. In: *Tissue engineering* 7 (2), S. 211–228. DOI: 10.1089/107632701300062859.

Zuk, P. A.; Zhu, M.; Ashjian, P.; Ugarte, D. A. de; Huang, J. I.; Mizuno, H. et al. (2002): Human adipose tissue is a source of multipotent stem cells. In: *Molecular biology of the cell* 13 (12), S. 4279–4295. DOI: 10.1091/mbc.E02-02-0105.

12 Publikationen

Schröder C., Erb D., Döring L., Rekkittke N., Khatri R., Linn T.. The effect of class-I specific histone-deacetylase inhibitors (HDACi) and a broad spectrum HDACi on differentiation of human mesenchymal stem cells, 59. Symposium der Deutschen Gesellschaft für Endokrinologie in München, Mai 2016

13 Erklärung zur Dissertation

„Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Arbeit selbständig und ohne unzulässige Hilfe oder Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nichtveröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze guter wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der „Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten sowie ethische, datenschutzrechtliche und tierschutzrechtliche Grundsätze befolgt. Ich versichere, dass Dritte von mir weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen, oder habe diese nachstehend spezifiziert. Die vorgelegte Arbeit wurde weder im Inland noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde zum Zweck einer Promotion oder eines anderen Prüfungsverfahrens vorgelegt. Alles aus anderen Quellen und von anderen Personen übernommene Material, das in der Arbeit verwendet wurde oder auf das direkt Bezug genommen wird, wurde als solches kenntlich gemacht. Insbesondere wurden alle Personen genannt, die direkt und indirekt an der Entstehung der vorliegenden Arbeit beteiligt waren. Mit der Überprüfung meiner Arbeit durch eine Plagiatserkennungssoftware bzw. ein internetbasiertes Softwareprogramm erkläre ich mich einverstanden.“

Ort, Datum

Unterschrift

14 Danksagung

Mein besonderer Dank gilt Herrn Professor Dr. Thomas Linn für die Möglichkeit unter seiner Anleitung eine Promotionsarbeit anfertigen zu dürfen. Ich danke ihm für die Überlassung dieses interessanten Themas und für die durchgehend intensive Betreuung. Ich bin dankbar für die Unterstützung und Motivation in schwierigen Zeiten, für konstruktive Hinweise und aufmunternde Worte auch über die Promotion hinaus. Ich danke ihm für die Möglichkeit einige seiner Publikationen als wissenschaftliche Grundlage nutzen zu dürfen und für die Erstellung des Erstgutachtens.

Ich danke Doris Erb für die Einarbeitung in die Techniken der experimentellen Laborarbeit. Ich danke ihr für das Mentoring und die dauerhafte Betreuung während meiner Zeit im Labor und weit darüber hinaus. Für das Erarbeiten von Methodik, die noch nicht im Labor etabliert war, für die Betreuung des wissenschaftlichen Hintergrundes und für gute Ratschläge an wichtigen Punkten meiner Promotionsarbeit.

Ich danke Dr. C.C. Maresch für die Einweisung in die statistische Auswertung meiner real-time PCR Ergebnisse und für wichtige Interpretationen diesbezüglich. Außerdem danke ich ihr für die Einarbeitung in die PCR-Methode und die Agarosegelelektrophorese. Weiter danke ich Qingkui Jiang für die Einarbeitung in die Methodiken der real-time PCR und RNA-Isolation. Gemeinsam mit euch hatte ich viele schöne Momente während der Zeit im Forschungslabor.

Ich danke Dr. N. Rekitke für den Austausch wichtiger Informationen bezüglich der Arbeit mit mesenchymalen Stammzellen. Ich danke ihr für die Hilfe bei der Durchführung der durchflusszytometrischen Zellcharakterisierung und bei der Auswertung dieser Versuche.

Ich danke Prof. Dr.-Ing. Peter Czermak für die geschenkte Stammzelllinie.

Ich danke meinem Kommilitonen und guten Freund Johannes für das Korrekturlesen meiner Arbeit, und für das Entfernen einer Vielzahl von Rechtschreib- und Grammatikfehlern. Ich danke dir für die gemeinsame Zeit in den Jahren des Studiums und danach.

Weiter danke ich Lisa-Marie für ihr Verständnis, ihre geduldige Art und für die Hilfe in schwierigen Zeiten der letzten Jahre. Ich wünsche mir noch viele schöne Momente mit Dir. Du machst mein Leben bunt.

Ich danke meinen Eltern, die mich während der Zeit meiner schulischen und medizinischen Ausbildung ebenso wie bei der Anfertigung der Dissertation stets unterstützten. Ohne Eure Hilfe wären mir diese Schritte verwehrt geblieben.

Das Leben der Eltern ist das Buch, in dem die Kinder lesen. (Augustinus Aurelius 354 - 430)

15 Lebenslauf

Der Lebenslauf wurde aus der elektronischen Version der Arbeit entfernt.