

**Die Wirkung des Sirtuininhibitors Tenovin-1 im Vergleich
zu den Histondeacetylaseinhibitoren SAHA und MS-275
auf den RETRA-induzierten Zelltod in p53-mutierten,
-Null und -Wildtyp Ewing-Sarkom-Zellen**

Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades
doctor medicinae (Dr. med.)

vorgelegt dem Rat der Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Schiller-Universität Jena

von Katharina Focke
geboren am 20.04.1989 in Gotha

Gutachter:

1. Prof. Dr. med. James Friderich Beck, Kinderklinik Jena
2. PD Dr. med. Sebastian Scholl, Klinik für Innere Medizin II Jena
3. Professor Dr. med. Holger Christiansen, Kinderklinik Leipzig

Tag der öffentlichen Verteidigung: 01.12.2014

Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µl	Mikroliter
µM	Mikromolar
AIF	Apoptosis-inducing factor
AML	Akute myeloische Leukämie
Apaf-1	apoptotic protease activation factor-1
Aqua dest.	destilliertes Wasser
ATP	Adenosintriphosphat
Bad	Bcl-2-associated death promoter (proapoptotisches Mitglied der Bcl-2-Familie)
Bak	Bcl-2 homologous antagonist killer (proapoptotisch)
Bax	Bcl-2-associated X protein (proapoptotisch)
Bcl-2	B-cell lymphoma 2-Proteinfamilie
BCL2A1	Bcl2-related protein A1 (antiapoptotisches Mitglied der Bcl-2-Familie)
Bcl-w	antiapoptotisches Mitglied der Bcl-2-Familie
Bcl-xL	B-cell lymphoma-extra large (antiapoptotisch)
Bid	BH3 interacting-domain death agonist (proapoptotisch)
Bik	Bcl-2-interacting killer (proapoptotisch)
Bim	Bcl-2 interacting mediator of cell death (proapoptotisch)
BIR-Domäne	baculovirus IAP repeat- Domäne
Bmf	Bcl-2-modifying factor (proapoptotisch)
bzw.	beziehungsweise
CDK	Cyclin-dependent kinase
cDNA	komplementäre DNA
cm ²	Quadratcentimeter
CO ₂	Kohlenstoffdioxid
CT	Computertomographie
CTCL	kutanes T-Zell-Lymphom
C _T -Wert	„threshold cycle“ (Schwellenwert)
cyt-c	Cytochrom c (proapoptotisch)
dATP	Desoxyadenosintriphosphat
DED	death effector domain
DEVD	Erkennungssequenz (Aspartat-Glutamat-Valin-Aspartat) für die Caspase-3
DIOC ₆ (3)	3,3'-Dihexyloxycarbocyaninjodid
DISC	death-inducing signal complex
DMEM	Dulbecco's Modified Eagle Medium
DMSO	Dimethylsulfoxid
DNA	Desoxyribonukleinsäure
DNase	Desoxyribonuklease
dNTP	Desoxyribonukleosidtriphosphat
DR	death receptor (Signaltransduktoren der Apoptose)
DSMZ	Leibniz-Institut DSMZ-Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendiamintetraacetat

EndoG	Endonuklease G
EWS	Ewing Sarcoma
FACS	“Fluorescence activated cell sorting”, hier Synonym für Durchflusszytometrie
FADD	Fas-associated death domain
FasL	Fas Ligand
FasR	Fas-Rezeptor (Todesrezeptor)
FKS	fetales Kälberserum
FLI1	Friend leukemia integration 1 transcription factor (Transkriptionsfaktor)
h	Stunde
HAT	Histonacetyltransferase
HDAC	Histondeacetylase
HDACi	Histondeacetylase-Inhibitor
HIF-1 α	hypoxia-inducible factor 1 α
IAP	inhibitor of apoptosis (Apoptoseinhibitor)
Mcl-1	myeloid leukemia cell differentiation protein 1 (antiapoptotisch)
MDM2	Mouse double minute 2 homolog (p53-Regulator)
MDMX	Synonym MDM4, Mouse double minute 4 (p53-Regulator)
MDS	Myelodysplastisches Syndrom
MEM NEAA	MEM Non essential amino acids
mg	Milligramm
MGB	Minor-Groove-Binder, Gruppe am Quencher
min	Minute
ml	Milliliter
mm	Millimeter
mM	Millimol
mm ³	Kubikmillimeter
mRNA	Boten-RNA
MRT	Magnetresonanztomographie
MS-275	Entinostat (Histondeacetylase-Inhibitor)
mtp53	mutiertes p53
NAD ⁺	Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid
NF- κ B	nuclear factor 'kappa-light-chain-enhancer' of activated B-cells (Transkriptionsfaktor)
nm	Nanometer
Noxa	Phorbol-12-myristate-13-acetate-induced protein 1 (proapoptotisches Mitglied der Bcl-2-Familie)
NSCLC	Nicht-kleinzelliges Bronchialkarzinom
Omi/HtrA2	High temperature requirement protein A2 (proapoptotisch)
Omniscript-RT	Omniscript-Reverse Transkriptase
p21	Cyclin-dependent kinase inhibitor 1 (Zellzyklusregulator)
p53	(tumor) protein 53 (Tumorsuppressorprotein)
p63	(tumor) protein 63 (Tumorsuppressorprotein)
p73	(tumor) protein 73 (Tumorsuppressorprotein)
PAI-1	plasminogen activator inhibitor 1
PARP	Poly (Adenosindiphosphatribose)-Polymerase
PBS	Phosphate Buffered Saline
PCR	Polymerasekettenreaktion
ph	ph-Wert

PI	Propidiumjodid (3,8-Diamino-5-(3-diethyl-aminopropyl)-6-phenylphenan-thridinium-iodid-methiodid)
PUMA	p53-upregulated modulator of apoptosis (proapoptotisch)
RETRA	Reactivation of transcriptional reporter activity (proapoptotisch)
RNA	Ribonukleinsäure
RNase	Ribonuklease
ROS	reaktive Sauerstoffspezies
rpm	Rotationen pro Minute
RPMI	Roswell Park Memorial Institute Medium
RT-PCR	Reverse Transkriptase-PCR
SAHA	Suberoylanilide hydroxamic Acid, Synonym Vorinostat (HDACi)
Sir2	Silent information regulator 2
SIRT	Sirtuine
SIRTi	Sirtuininhibitoren
Smac/DIABLO	second mitochondria-derived activator of caspases (proapoptotisch)
TAp73	Isoform des p73 mit Transaktivationsdomäne
tBid	funktionsfähige Form des Bcl-2-Proteins Bid
TGF- β	transforming growth factor β (Wachstumsfaktor)
TGF- β -RII	transforming growth factor β receptor
TNF	Tumor necrosis-factor (Zytokin)
TNFR	Tumor necrosis-factor receptor
TRADD	TNFR-associated death domain
WAF1/CIP1	Synonym für p21
β 2M	β -2-Mikroglobulin, hier Housekeeping-Gen

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis

1. Zusammenfassung	1
2. Einleitung	3
2.1 Maligne Knochentumore des Kindes	3
2.2 Das Ewing-Sarkom	3
2.2.1 Definition	3
2.2.2 Epidemiologie	4
2.2.3 Lokalisation	4
2.2.4 Klinisches Bild	5
2.2.5 Diagnostik	5
2.2.6 Staging	6
2.2.7 Prognosefaktoren	6
2.2.8 Therapie	7
2.3 Mechanismen der Tumorentstehung	8
2.4 Epigenetik	9
2.4.1 DNA-Methylierung	10
2.4.2 Histonmodifikation	10
2.4.2.1 Histonacetyltransferasen	12
2.4.2.2 Histondeacetylasen	12
2.4.2.3 Sirtuine	14
2.5 Histondeactylaseinhibitoren	16
2.5.1 Wirkungen der HDACi	17
2.5.2 Substanzklassen	18
2.5.3 SAHA	20
2.5.4 MS-275	21
2.6 Tenovin-1	22
2.7 Familie der Tumorsuppressorproteine um p53	23
2.7.1 p53	23
2.7.2 p73	24

2.8 p73-Aktivator RETRA	26
2.9 Zelltod	26
2.9.1 Apoptose	27
2.9.1.1 Intrinsischer Weg	29
2.9.1.2 Extrinsischer Weg	30
3. Zielstellung der Arbeit	32
4. Material und Methoden	33
4.1 Material	33
4.1.1 Zelllinien	33
4.1.2 Zellkulturbedarf	34
4.1.3 Chemikalien und Reagenzien	35
4.1.4 Fluoreszenzfarbstoffe	36
4.1.5 Reagenzien für die mRNA-Expressionsanalyse	36
4.1.5.1 Primer-Sonden-Mixe	36
4.1.5.2 Kits und andere Reagenzien	36
4.1.6 Geräte	36
4.1.7 Arbeitsmaterialien	37
4.1.8 Software	38
4.2 Methoden	38
4.2.1 Kultivierung der Zellen	38
4.2.1.1 In-Kulturnahme der Zellen	39
4.2.1.2 Kollagenbeschichtung	39
4.2.1.3 Passagieren der Zellen	40
4.2.1.4 Einfrieren der Zellen	40
4.2.1.5 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität	41
4.2.1.6 Test auf Mycoplasmen	41
4.2.2 Zellbehandlung	42
4.2.3 Durchflusszytometrie (FACS)	43
4.2.3.1 Analyse des Zelltodes mittels Propidiumjodid	44
4.2.3.2 Analyse des mitochondrialen Membranpotentials	44
4.2.3.3 Zellzyklusbestimmung	45
4.2.4 Bestimmung der Caspase-3-Aktivität	46

4.2.5 Genexpressionsanalyse von p21	48
4.2.5.1 RNA-Isolation mithilfe des PeqGold Total RNA Kit	49
4.2.5.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA	50
4.2.5.3 Umschreiben der RNA in c-DNA mittels Omniscript® RT Kit	51
4.2.5.4 „Real time“ RT-PCR (TaqMan®)	51
5. Ergebnisse	56
5.1 Wirkung von Tenovin-1 im Vergleich mit den HDACi SAHA und MS-275 in SK-ES1-Zellen	57
5.1.1 Zelltodbestimmung mittels Durchflusszytometrie	57
5.1.2 Bestimmung der subG ₁ -Fraktion des Zellzyklus	59
5.1.3 Analyse der Caspase-3-Aktivität	60
5.2 Wirkung von Tenovin-1 im Vergleich mit den HDACi SAHA und MS-275 in RD-ES-Zellen	63
5.2.1 Zelltodbestimmung mittels Durchflusszytometrie	63
5.2.2 Analyse der Caspase-3-Aktivität	64
5.3 Wirkung von Tenovin-1 im Vergleich mit den HDACi SAHA und MS-275 in SK-N-MC-Zellen	65
5.3.1 Zelltodbestimmung mittels Durchflusszytometrie	65
5.3.2 Bestimmung der subG ₁ -Fraktion des Zellzyklus	67
5.3.3 Analyse der Caspase-3-Aktivität	68
5.4 Wirkung von Tenovin-1 im Vergleich mit den HDACi SAHA und MS-275 in WE-68-Zellen	69
5.4.1 Zelltodbestimmung mittels Durchflusszytometrie	70
5.4.2 Bestimmung der subG ₁ -Fraktion des Zellzyklus	72
5.4.3 Analyse der Caspase-3-Aktivität	73
5.5 Wirkung von Tenovin-1 im Vergleich mit den HDACi SAHA und MS-275 in CADO-ES1-Zellen	73
5.5.1 Zelltodbestimmung mittels Durchflusszytometrie	74
5.6 p21-Genexpressionsanalysen mittels „Real time“ RT-PCR (TaqMan®)	74
5.6.1 p21-Genexpressionsanalyse in mtp53-Zellen	75

5.6.2 p21-Genexpressionsanalyse in Nullp53-Zellen	77
5.6.3 p21-Genexpressionsanalyse in p53-Wildtyp-Zellen	78
6. Diskussion	81
7. Schlussfolgerungen	89
8. Literaturverzeichnis	91
9. Anhang	100

1. Zusammenfassung

Das Ewing-Sarkom ist der zweithäufigste primäre Knochentumor im Kindesalter (Balamuth und Womer 2010). Zwar konnte in den letzten Jahrzehnten dank verbesserter Therapiemöglichkeiten das progressionsfreie Überleben erhöht werden, jedoch weist eine metastasierte Erkrankung immer noch eine schlechte Prognose und ein Überleben von maximal 30 % auf (Cotterill et al. 2000, Burgert et al. 1990). Somit zeigt sich die Notwendigkeit alternativer Therapieformen, die zur Erhöhung der Überlebensrate führen und gleichzeitig mit einer geringeren systemischen Toxizität verbunden sind.

Die in diesem Zusammenhang durchgeführte Forschungsarbeit untersuchte die antineoplastischen Effekte der Behandlung der Histondeacetylase-Inhibitoren (HDACi) SAHA und MS-275 bzw. des Sirtuininhibitors (SIRTi) Tenovin-1 in Kombination mit dem p73-Aktivator RETRA in Ewing-Sarkom-Zellen mit unterschiedlichem p53-Status. RETRA ist ein neuer niedermolekularer Wirkstoff, der die Interaktion zwischen dem mutierten Tumorsuppressorprotein p53 und p73 inhibiert, wodurch das freie p73 seine Tumorsuppressoraktivität entfalten kann (Kravchenko et al. 2008). Zur Untersuchung des Zelltodes wurden zytometrische Analysen, wie die Propidiumjodid-Aufnahme, die Messung des mitochondrialen Membranpotenzials sowie die Zellzyklusanalyse verwendet. Des Weiteren diente der Caspase-3-Aktivitätstest zum Nachweis des intrinsischen Signalweges der Apoptose. Sowohl in mutierten, Null- und Wildtyp-p53-Zellen konnte durch die Behandlung von RETRA der Zelltod induziert werden. Dieser zytotoxische Effekt konnte in allen Zelllinien durch die jeweilige Applikation mit den HDACi SAHA und MS-275 deutlich gesteigert werden. Hingegen wurde durch die Zugabe des SIRTi Tenovin-1 eine konzentrationsabhängige Abschwächung der Zytotoxizität von RETRA in allen Zelllinien beobachtet. Die Bedeutung der Sirtuine im Rahmen der Tumorbilogie ist zum momentanen Zeitpunkt umstritten. Je nach Tumorentität und beteiligtem Signalweg vermögen vor allem SIRT1 und 2 eine Tumorsuppression oder – promotion auszulösen (Sebastián et al. 2012, Yuan et al. 2013). In diesem Zusammenhang sollten Genexpressionsanalysen des p21, eines Zielgens von p53, einen Aufschluss über den Wirkungsmechanismus geben. Durch die alleinige Behandlung mit SAHA und RETRA bzw. auch deren Kombination zeigte sich eine gesteigerte mRNA-Expression des p21 in allen Zelllinien. Hingegen führte Tenovin-1 in alleiniger Applikation zu keiner Änderung der Genexpression in den mutierten und

Null-p53-Zellen, jedoch zu einer starken Induktion des p21 in Wildtyp-p53-Zellen. In Kombination mit RETRA ließ sich eine deutliche Abschwächung der RETRA-induzierten p21-Expression in den mutierten, Null- und Wildtyp-p53-Zellen feststellen.

In meiner Promotion konnte somit die Verstärkung des RETRA-induzierten Zelltodes durch die Zugabe der HDACi SAHA und MS-275 unabhängig vom p53-Status nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu fand durch den Sirtuininhibitor Tenovin-1 eine Abnahme des RETRA-induzierten Zelltodes statt, was eine mögliche tumorsuppressive Funktion der Sirtuine in Ewing-Sarkom-Zellen vermuten lässt. Diese Ergebnisse zeigen die mögliche Verwendung der HDACi SAHA und MS-275, nicht aber Tenovin-1, in Kombination mit RETRA als neue erfolgsversprechende Antitumorthherapie des Ewing-Sarkoms auf.

2. Einleitung

2.2 Maligne Knochentumore des Kindes

In Deutschland sind jährlich circa 2300 (Stand 2011) Kinder bis zum 15. Lebensjahr von einer Tumorerkrankung betroffen. Hiervon leiden nach Angaben des Deutschen Kinderkrebsregisters der Johannes Gutenberg-Universität Mainz 4,5% an einem malignen Knochentumor. Zu den Malignomen des Knochens im Kindesalter zählen nach der Internationalen Klassifikation der Krebserkrankungen bei Kindern (ICCC-3) das Osteosarkom, Chondrosarkom, Ewing-Sarkom und verwandte Knochensarkome sowie nicht bzw. anders spezifizierte Knochentumoren (Steliarova-Foucher et al. 2005). Das Ewing-Sarkom ist das zweithäufigste primäre Malignom des Knochens im Kindes- und Jugendalter (Balamuth und Womer 2010, Grier 1997). Trotz verbesserter Überlebenschancen in den letzten Jahrzehnten durch eine Kombinationschemotherapie liegt bei erfolgter Metastasierung eine schlechte Prognose und ein Überleben von unter 30% vor (Cotterill et al. 2000). Die Suche nach neuen molekularen Therapiestrategien zur Verbesserung des Überlebens und der Lebensqualität besitzt somit eine hohe Bedeutung.

2.2 Ewing-Sarkom

2.2.1 Definition

Der 1921 von James Ewing zuerst beschriebene Tumor gehört zur Gruppe der Ewing-Tumore, die morphologisch ähnliche Neoplasien beinhalten. Dazu zählen das Ewing-Sarkom, das atypische Ewing-Sarkom und maligne periphere neuroektodermale Tumore (PNET oder MPNET) (Delattre et al. 1994). Charakteristisch für diese Gruppe ist eine gemeinsame molekulargenetische Besonderheit des Chromosom 22, wobei 90 % der Fälle eine t(11;22)-Translokation (Abbildung 2-1) aufweisen (Turc-Carel et al. 1988). Durch diese meist balancierte Translokation wird das Ewing Sarcoma (EWS)-Gen, das sich auf dem langen Arm des Chromosom 22q12 befindet, mit bestimmten Transkriptionsfaktoren der ETS-Familie fusioniert. Ein häufig bei der Translokation beteiligter Transkriptionsfaktor ist der Friend leukemia integration 1 transcription factor (FLI1). Das FLI1-Gen befindet sich auf dem Chromosom 11q24 und steht in Zusammenhang mit physiologischen Funktionen der Embryonalentwicklung sowie Zelldifferenzierung und –wachstum (Delattre et al. 1994, Sandberg und Bridge 2000, Ludwig 2008). In circa 95 % der

Ewing-Sarkome entstehen durch die Translokation des Fusionsprodukts FLI-1/EWS, welches onkogene Aktivität besitzt (May et al. 1993). Somit weist das Ewing-Sarkom eine klare genetische Disposition auf.

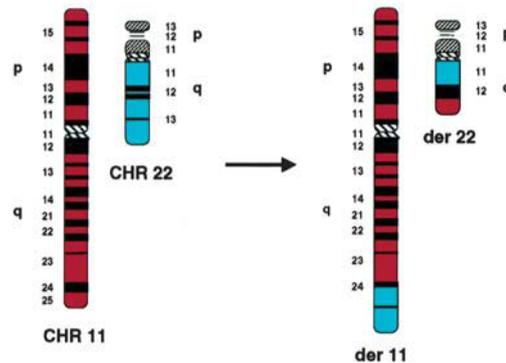


Abbildung 2-1: Schematische Darstellung der charakteristischen Translokation des Ewing-Sarkoms $t(11;22)(q24;q12)$ (de Alava und Gerald 2000)

2.2.2 Epidemiologie

Das Ewing-Sarkom tritt zwischen dem 5. und dem 30. Lebensjahr auf, wobei der Altersgipfel um das 15. Lebensjahr liegt. Obwohl das Ewing-Sarkom häufiger bei Kindern und Jugendlichen vorkommt, ist ein Auftreten bei Erwachsenen ebenfalls möglich. Laut des Deutschen Kinderkrebsregisters liegt die jährliche Inzidenz für Ewing-Tumoren bei Kindern unter 15 Jahren bei circa 3/1.000.000. Das männliche Geschlecht prädisponiert geringfügig für das Auftreten mit einem Faktor von 1,5 (Parkin et al. 1993). Außerdem ist diese Tumorentität deutlich häufiger in der weißen Bevölkerung und sehr selten bei Afrikanern oder Asiaten (Parkin et al. 1993, Hogendoorn et al. 2010).

2.2.3 Lokalisation

Häufige Einzellokalisationen (siehe Abbildung 2-2) stellen bei 26 % der Patienten das Becken sowie bei circa 46 % die langen Röhrenknochen der unteren Extremität (Femur, Tibia und Fibula) dar (Bernstein et al. 2006, Paulino et al. 2007). Ebenso können die Wirbelsäule (6 %), Rippen (10 %) und praktisch jeder Knochen betroffen sein (Cotterill et al. 2000, Paulino et al. 2007). In 5 % der Fälle ist ein alleiniges extraossäres Auftreten als Weichteilsarkom beschrieben worden. Die Prognose bei

gleichem Behandlungsschema zeigt für Weichteil- und Knochen-Ewing-Sarkome keine Unterschiede (Hogendoorn et al. 2010).

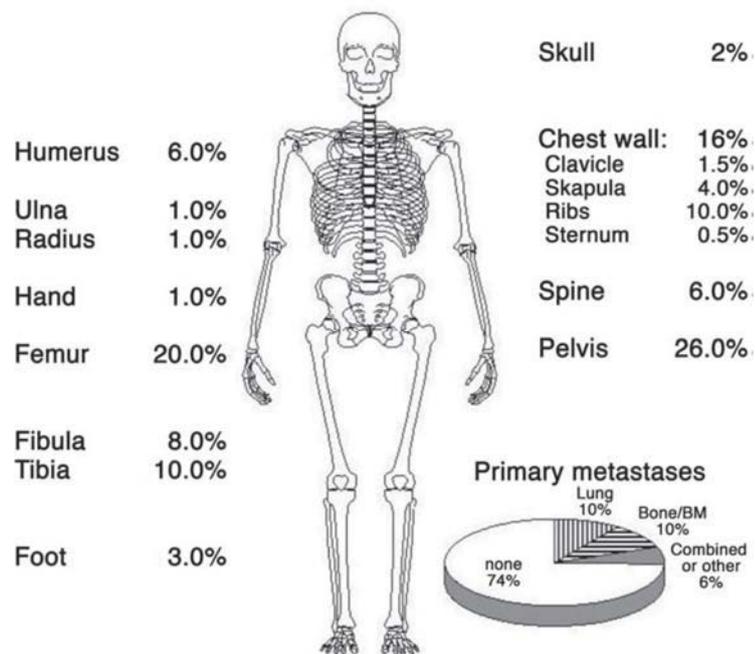


Abbildung 2-2: Darstellung der Primärlokalisationen und Metastasen des Ewing-Sarkoms (Bernstein et al. 2006)

2.2.4 Klinisches Bild

Klinische Beschwerden durch das Ewing-Sarkom sind denen der akuten Osteomyelitis sehr ähnlich. Dabei stehen lokale Schwellung, Rötung, Überwärmung, Schmerz und Funktionsverlust im Vordergrund. Außerdem können Fieber und allgemeines Krankheitsgefühl auftreten. Meist tritt die Schmerzsymptomatik nach einem banalen Trauma auf und bleibt über Wochen intermittierend oder belastungsabhängig bestehen, was die Diagnose eines Tumors verzögern kann (Hogendoorn et al. 2010).

2.2.5 Diagnostik

Zur Diagnostik sind bildgebende Verfahren und eine Probenentnahme des Tumors nötig. Charakteristisch ist das Auftreten an den Diaphysen/ Metaphysen der langen Röhrenknochen mit einer typischen Osteolyse („Mottenfraß“), zwiebelschalenartigen Abhebung des Periosts und möglichen pathologischen Frakturen. Des Weiteren kann es zur Infiltration des umgebenden Weichteilgewebes mit Weichteilschwellung

kommen. Damit die gesamte Tumorregion und auch mögliche Skipmetastasen detektiert werden, sind ein Schnittbildverfahren und Volumetrie erforderlich. Zur Betrachtung der Lagebeziehung des Tumors sowie zur Berechnung des prognostisch relevanten Tumolvolumens eignet sich aufgrund des hohen Weichteilkontrastes der Magnetresonanztomograph (MRT). Darüber hinaus stellt das MRT die Grundlage für eine weitere Verlaufskontrolle und spätere operative Therapie dar (Meyer et al. 2008).

Zur Sicherung der Diagnose wird eine Biopsie mit Entnahme von Tumorgewebe zur histologischen und molekulargenetischen Analyse benötigt. Das Ewing-Sarkom wird histopathologisch in die heterogene Gruppe der "Small-round-cell-tumors" eingeteilt. Diese Tumore besitzen kleine, runde, blaue, undifferenzierte Zellen (Delattre et al. 1994). Aufgrund ihrer Histopathologie werden alle Ewing-Tumore als hochmaligne eingestuft. Zur Abgrenzung von den anderen klein-, rund- und blauzelligen Tumoren kann ein molekulargenetischer Nachweis der bereits erwähnten Translokation des Chromosom 22 Anwendung finden (Delattre et al. 1994, Turc-Carel et al. 1988).

2.2.6 Staging

Die klassische TMN-Klassifikation für Tumoren findet bei der Stadieneinteilung und Klassifikation des Ewing-Sarkoms in der Praxis selten Anwendung. Vielmehr wird lediglich eine lokoregionale Erkrankung von einer primären Metastasierung unterschieden, da eine Fernmetastasierung eine deutlich schlechtere Prognose hinsichtlich des Überlebens aufweist (Haeusler et al. 2010). Circa 20 bis 30 % der Patienten besitzen bereits beim Stellen der Diagnose eine metastasierte Erkrankung (Haeusler et al. 2010). Dabei befinden sich 50 % der Metastasen in der Lunge, 25 % im Knochengewebe und 20 % im Knochenmark (Grier 1997). Andere Lokalisationen der Metastasen, wie beispielsweise Lymphknoten, Gehirn oder Leber sind selten (Paulino et al. 2004).

2.2.7 Prognosefaktoren

Circa 80 % der Patienten weisen ohne systemische Therapie Fernmetastasen auf, was vermutlich durch schon zur Diagnostizierung vorhandene okkulte Metastasen zu erklären ist. Es kann somit davon ausgegangen werden, dass das Ewing-Sarkom eine systemische Erkrankung darstellt. In diesem Zusammenhang wurden durch verschiedene Arbeitsgruppen Einflussfaktoren auf das Überleben der Patienten und

die Prognose untersucht, die innerhalb der Studienlage jedoch teilweise erheblich variieren. Sicher ist, dass die Prognose hauptsächlich von der detektierbaren Metastasierung zum Diagnosezeitpunkt abhängt. Hierbei weisen Patienten mit Metastasierung der Lungen im Vergleich zu Patienten mit Knochenmetastasen bzw. einer Kombination von Lungen- und Knochenbeteiligung ein besseres Überleben auf (Cotterill et al. 2000). Das Volumen des Tumors ist ebenfalls prognostisch relevant, unabhängig von der Lokalisation des Primärtumors (Ahrens et al. 1999, Steliarova-Foucher et al. 2005).

Kommt es zum Rezidiv, besteht ein schlechtes Outcome trotz konventioneller Chemotherapie. Patienten, die innerhalb von zwei Jahren nach Diagnosestellung eine rekurrente Tumorerkrankung erleiden, versterben fast ausnahmslos an ihrer Erkrankung (Cotterill et al. 2000).

2.2.8 Therapie

Die Therapie des Ewing-Sarkom beruht auf den Ergebnissen der EURO-E.W.I.N.G 99-Therapiestudie (EUROpean Ewing tumour Working Initiative of National Groups 1999) (Juergens et al. 2006). Die Behandlung des Ewing-Sarkoms besteht nach diesem Protokoll aus einer systemischen Chemotherapie in Kombination mit Lokaltherapie. Dabei wird zunächst nach einer initialen Biopsie eine präoperative chemotherapeutische Induktion durchgeführt. Es schließt sich eine operative und/oder radiotherapeutische Lokalbehandlung sowie eine postoperative adjuvante Chemotherapie an. Die gesamte Behandlung erstreckt sich über einen Zeitraum von acht bis zwölf Monaten (Paulussen et al. 2009). Eingesetzte Zytostatika umfassen Alkylanzien (Ifosfamid, Cyclophosphamid), Vincaalkaloide (Vincristin), Anthrazykline (Doxorubicin) sowie Etoposid und Actinomycin D. Dabei werden Kombinationen aus vier bis sechs Zytostatika angewendet (Juergens et al. 2006), weshalb ein engmaschiges Monitoring der Patienten erforderlich ist, da hämato-, kardio-, pulmo- und nephrotoxische Effekte sowie weitere schwerwiegende Nebenwirkungen auftreten können.

Führt die standardisiert dosierte Chemotherapie bei nichtmetastasiertem Ewing-Sarkom nicht zum Erfolg bzw. zum histologischen Nichtansprechen des Tumors, kann eine zusätzliche Hochdosistherapie mit Busulfan und Melphalan in Kombination mit einer Stammzell-Rescue erwogen werden (Ferrari et al. 2011).

Die Lokalthherapie umfasst eine chirurgische und radiotherapeutische Intervention. Bei der Planung müssen sowohl die Primärlokalisierung und auch die Größe des Tumors berücksichtigt werden. Bei der chirurgischen Lokalthherapie sollte immer eine „weite Resektion“ innerhalb des Gesunden angestrebt werden (Sluga et al. 2001).

Bei gutem Ansprechen des Tumors auf die präoperative Chemotherapie können eventuelle ablative Eingriffe durch rekonstruktiv-chirurgische Verfahren vermieden werden. Ist eine chirurgische Intervention nicht möglich bzw. eine geringe Chemoresponse des Tumors festzustellen, sollte eine fraktionierte Radiotherapie erfolgen (Schuck et al. 2003).

Es wird empfohlen die Behandlung von Patienten mit Ewing-Sarkom aufgrund der Seltenheit dieser Tumorerkrankung nur in spezialisierten Kliniken durchzuführen. In Deutschland sollte die Behandlung im Rahmen der Ewing-Sarkom-Studie „Ewing 2008“ des Universitätsklinikums Münster erfolgen.

Durch die bereits beschriebene Kombinationstherapie hat sich das progressionsfreie Überleben der Patienten mit einer lokalisierten Tumorerkrankung in den letzten Jahrzehnten auf 60 bis 70 % verbessert (Burgert et al. 1990), jedoch weisen Patienten mit metastasiertem Ewing-Sarkom zum Zeitpunkt der Diagnosestellung weiterhin lediglich ein Überleben von 18 bis 30% auf (Cotterill et al. 2000).

2.3 Mechanismen der Tumorentstehung

Die Transformation einer normalen in eine entartete, maligne Zelle wird als ein multifaktorieller Prozess verstanden, der sich meist über viele Jahre erstreckt und in verschiedene zelluläre Signalwege eingreift (Hanahan und Weinberg 2000). Die Tumorentstehung wurde lange Zeit lediglich als eine genetische Erkrankung definiert, die als auslösende Ursache Mutationen, also Veränderungen der Genomsequenz aufweist. Im Rahmen neuerer Forschung zeigte sich, dass auch epigenetische Prozesse einen zentralen Stellenwert besitzen. Durch diese genetischen und epigenetischen Veränderungen erlangt die Tumorzelle neue funktionelle Kompetenzen. Hanahan und Weinberg 2000 nennen sechs essentielle Veränderungen der Zellphysiologie: Insensitivität gegenüber wachstumshemmenden Signalen, Unabhängigkeit von Wachstumsstimulation, Resistenz gegenüber Apoptose, unbegrenzte Replikationsmöglichkeit, Angiogenese, Invasion in Gewebe und Dissemination von Tumorzellen (Metastasierung).

Beteiligte Gene an der Tumorentstehung sind sogenannte Tumorsuppressorgene, Onkogene und Stabilitätsgene. Ein ungehemmtes Zellwachstum resultiert aus einer Dysregulation dieser Gene. Hierbei entstehen Onkogene aus Proto-Onkogenen, die normalerweise die Zellteilung kontrollieren und noch keine tumorigene Wirkung besitzen. Ursächlich für die Aktivierung eines Onkogens sind Punktmutationen, chromosomale Translokationen oder Genamplifizierungen. Aus diesen genetischen Veränderungen resultiert ein vermehrtes Zellwachstum, da die aktivierten Onkogene den Zellzyklus stimulieren. Onkogene kodieren für Wachstumsfaktoren und deren Rezeptoren, intrazelluläre Signalproteine und Transkriptions- und Replikationsfaktoren. Tumorsuppressorgene hingegen bewirken eine Hemmung der Zellproliferation. Ihre Genprodukte können den programmierten Zelltod auslösen und sind an der Zellzykluskontrolle beteiligt. Bei Defekt der Tumorsuppressorgene durch eine Mutation verlieren diese ihre antiproliferative Eigenschaft und ein unkontrolliertes übermäßiges Zellwachstum folgt. Bekannte Tumorsuppressorgene sind das Retinoblastom-Gen und das p53-Gen (Payne und Kemp 2005, Vogelstein und Kinzler 1993, Vogelstein und Kinzler 2004). Auf letzteres wird in den nachfolgenden Kapiteln ausführlicher eingegangen. Die Stabilitäts- oder auch Caretaker-genannten Gene sind an Reparaturprozessen der DNA bei Auftreten von Replikationsfehlern oder Einwirkung von mutagenen Substanzen beteiligt. Sie kontrollieren Mismatch-, Nukleotid-Exzision- und Basen-Exzisionsreparatur und können durch Mutation inaktiviert werden.

Mutationen in den beschriebenen drei Klassen von Genen können bei betroffenen somatischen Zellen zu sporadischen Tumoren und bei betroffenen Keimzellen zu einer Prädisposition für hereditäre Neoplasien führen. Es bedarf multipler Mutationen, um eine neoplastisch transformierte Zelle entstehen zu lassen (Vogelstein und Kinzler 1993 und 2004).

2.4 Epigenetik

Genetische Veränderungen allein erklären nicht die Entstehung verschiedener Tumorarten und deren unterschiedliche Phänotypen (Esteller 2008). Epigenetische Mechanismen sind in diesem Zusammenhang in den Fokus der aktuellen Tumorforschung gerückt.

Die Epigenetik umfasst alle Veränderungen des Genoms und der Genexpression, die nicht auf eine Veränderung der DNA-Sequenz zurückzuführen sind (Holliday 1987).

Die zwei wesentlichen epigenetischen Mechanismen sind die DNA-Methylierung und die Modifikation von Histonen. Da beide epigenetischen Prozesse im Gegensatz zu Mutationen reversibel sind, lässt sich die klinische Verwendung im Sinne einer möglichen Therapie von Malignomen ableiten (Esteller 2008, Bernstein et al. 2007).

2.4.1 DNA-Methylierung

Die Kontrolle der Genaktivität wird wesentlich durch die Methylierung der DNA bestimmt. Diese erfolgt durch DNA-Methyltransferasen meist an sogenannten Cytosin- und Guaninreichen CpG-Inseln am Cytosin-Pyrimidinring. Die Methylierung ist gewebespezifisch und spielt eine Rolle bei der Inaktivierung des X-Chromosoms der Frau, der regelrechten Organisation und damit Beeinflussung der Aktivität des Chromatins sowie des genomischen Imprintings.

In humanen Tumoren wurde eine globale Hypomethylierung der DNA beobachtet, die unter anderem durch eine chromosomale Instabilität und Aneuploidie zu vermehrtem Tumorwachstum beitragen. Des Weiteren wurde eine Hypermethylierung von CpG-Inseln der Promotoren der Tumorsuppressorgene und damit deren Inaktivierung beschrieben (Esteller 2008, Esteller und Herman 2002).

2.4.2 Histonmodifikation

Mehr als 100 posttranslationale Modifikationen von Histonen sind beschrieben, von denen jedoch im Sinne der epigenetischen Regulation vor allem die Acetylierung und Methylierung einen zentralen Stellenwert besitzen.

Histone interagieren als basische Proteine, die positiv geladen sind, mit der durch den Phosphatgehalt negativ geladenen DNA und dienen somit der Verpackung und Organisation des Chromatins im Zellkern. Das Chromatin entspricht dabei einer hoch-organisierten, dynamischen Struktur, die sich aus repetitiv wiederkehrenden Nukleosomen zusammensetzt. Die räumliche Struktur des Chromatins entscheidet über die Zugänglichkeit von Transkriptionsfaktoren und folglich über die Expression von Genen. Die Histonproteine sind somit neben der räumlichen Organisation der DNA wesentlich an der Expression von Genen beteiligt (de Ruijter et al. 2003).

Jeweils zwei Kopien der Histone H2A, H2B, H3 und H4 lagern sich zu einem Oktamer zusammen. 164 Basenpaare der Doppelstrang-DNA winden sich um ein Oktamer und formen als Komplex das bereits erwähnte Nukleosom als Grundeinheit des Chromatins. Die kurze Strecke der DNA zwischen den Nukleosomen wird durch

das H1-Histon als „linker“-Histon verbunden und stabilisiert. Durch den Acetylierungsstatus der vier Kernhistone wird die Chromatinstruktur beeinflusst. Die posttranslationale Modifikation im Sinne einer De/Acetylierung findet am aminoterminalen Ende statt, wobei diese Region besonders Lysin-reich ist (Marks et al. 2001). Die Acetylierung der Lysine von Histonen führt generell zu einer besseren Zugänglichkeit des Chromatins und damit zur transkriptionellen Aktivierung. Die Acetylierung der Lysinreste schwächt die positive Ladung der Histone ab und die Bindung zu der negativ geladenen DNA wird vermindert. Demzufolge lockert sich die Chromatinstruktur (Euchromatin), wodurch das Ablesen des DNA-Stranges und eine vermehrte Genexpression erreicht wird (siehe Abbildung 2-3). Allerdings zeigte sich in Genexpressionsanalysen, dass durch die Behandlung mit Histondeacetylase-Inhibitoren (HDACi) ebenso viele Gene induziert als auch reprimiert werden können (Xu et al. 2007).

Durch die Lysin-Methylierung bzw. Hypoacetylierung wird eine Repression der Genexpression erreicht, da die Chromatinstruktur dichter (Heterochromatin) und das Ablesen des DNA-Stranges erschwert werden (Bernstein et al. 2007, de Ruijter et al. 2003, Marks et al. 2001). Zwei wichtige gegensätzliche Enzymklassen sind an der Regulation des Acetylierungsstatus der Histone beteiligt: Histonacetyltransferasen (HAT) und Histondeacetylrasen (HDAC). HATs bewirken die Acetylierung der Histone, während die HDACs die Acetylgruppen entfernen (dargestellt in Abbildung 2-4).

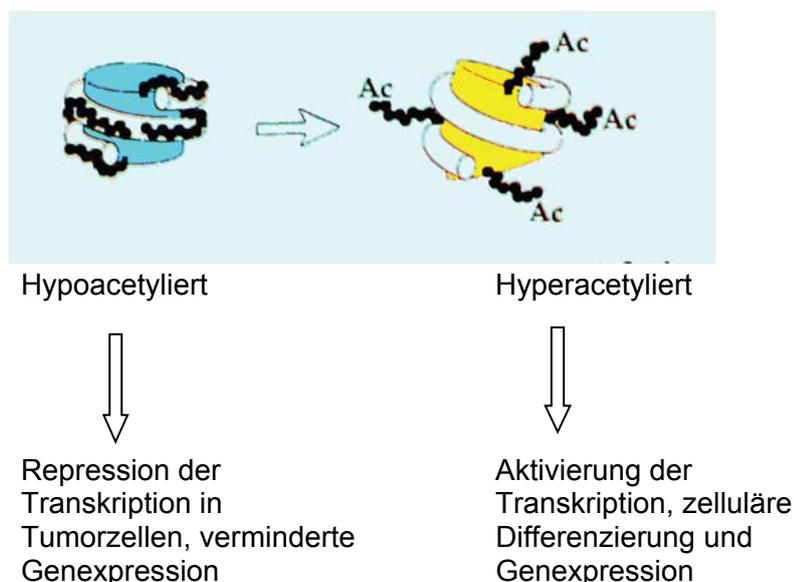


Abbildung 2-3: Regulation der Transkription und Genexpression abhängig vom Acetylierungsstatus der Histone (modifiziert nach Duvic und Vu 2007)

2.4.2.1 Histonacetyltransferasen

Die HAT werden in verschiedene Subtypen unterteilt: die GNAT-Familie, die MYST-Gruppe und die p300/CBP-Familie. Die Acetylierung erfolgt hierbei nicht zufällig, sondern an spezifischen Lysinsubstraten von Histonen und Nichthistonen. Die Acetylierung führt, wie bereits erwähnt, zu einer gesteigerten transkriptionellen Aktivität von Genen, darunter besonders den Tumorsuppressorgenen (Marks et al. 2001).

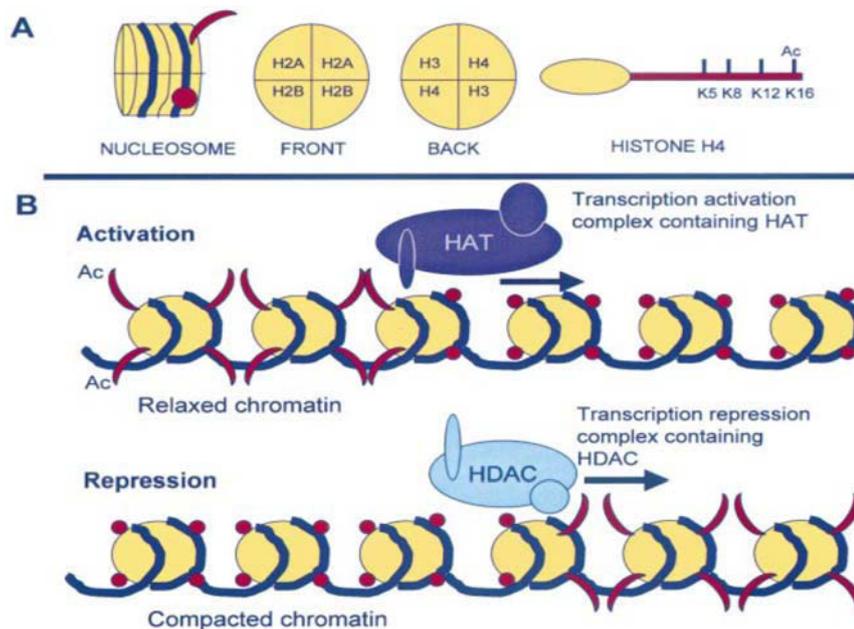


Abbildung 2-4: Schematische Darstellung der Histonmodifikation durch HDAC und HAT

(A) stellt eine Abbildung eines Nucleosoms dar. Hierbei ist das Histonoktamer als gelber Kreis und die modifizierbaren Lysinreste in roter Farbe aufgeführt. Ein roter Kreis repräsentiert den deacetylierten Zustand und somit die Repression der Genexpression. Hingegen symbolisiert der rote Strich den acetylierten Zustand und folglich die Genaktivierung.

(B) zeigt die transkriptionelle Aktivierung und Repression durch die enzymatische Aktivität von HAT und HDAC. Die Symboldarstellung ist identisch mit der in Abbildung (A), wobei die DNA hier zusätzlich als blaue Kette dargestellt ist, die die Histonoktamere verbindet. Die Pfeile geben die Richtung an (de Ruijter et al. 2003).

2.4.2.2 Histondeacetylasen

HDAC sind wesentlich an der transkriptionellen Repression durch die Entfernung der Acetylgruppen von Histonlysinen beteiligt. Sie werden nach ihrer Homologie zu den HDAC von Hefen in vier humane HDAC-Klassen unterteilt. Während die HDAC

Klasse I, II und IV für die enzymatische Aktivität Zink benötigen, weist die Klasse III, auch Sirtuine genannt, eine Abhängigkeit von Nicotinsäureamid-Adenin-Dinukleotid (NAD⁺) auf (Xu et al. 2007). HDAC sind nicht redundant in ihrer Funktion und weisen unterschiedliche Lokalisation hinsichtlich ihres Vorkommens im Gewebe und innerhalb der Zelle auf.

Die Klasse I besitzt eine Homologie zu dem Hefeprotein Ppd3. Zu dieser Klasse werden HDAC1, 2, 3 und 8 gezählt, die im Zellkern vorkommen und ubiquitär im humanen Gewebe exprimiert sind. Die Klasse II enthält die HDAC4, 5, 6, 7, 9 und 10 und ist homolog zum Hefeprotein Histon Deacetylase 1 (Hda1). Sie wird nochmals in eine Subklasse IIa (HDAC4,5,7 und 9) und IIb (HDAC6 und 10) unterteilt, wobei letztere zwei katalytische Zentren besitzt. Die Klasse II Enzyme befinden sich vor allem im Zytoplasma, können allerdings zwischen Zellkern und Zytoplasma migrieren. Ihre Expression ist auf bestimmte Gewebe beschränkt (Marks et al. 2001, Xu et al. 2007). Die dritte Klasse weist eine Homologie zum Hefeprotein Sir2 (Silent information regulator 2) auf und wird im nachfolgenden Abschnitt genauer erläutert. HDAC11 ist das einzige Mitglied der Klasse IV, das konservierte Regionen in den katalytischen Zentren ähnlich den Enzymen der Klasse I und II besitzt und zumeist im Zellkern auftritt. Jedoch ist eine Zuordnung der HDAC11 in eine dieser Klassen nicht möglich, da zu große Unterschiede hinsichtlich der Sequenz bestehen (Villar-Garea und Esteller 2004, de Ruijter et al. 2003).

Phylogenetische Analysen zeigen Nicht-Histon-Proteine als ursprüngliche Zielsubstrate der HDAC auf. Zu diesen Nicht-Histon-Proteinen zählen Transkriptionsfaktoren und deren Regulatorproteine (p53), Signaltransduktoren, Chaperone, DNA-Reparaturenzyme, Steroidrezeptoren (Androgenrezeptor, Östrogenrezeptor α), Strukturproteine (α -Tubulin) sowie Entzündungsmediatoren. Deren Aktivität, Stabilität oder Interaktion wird durch die Acetylierung entweder verstärkt oder abgeschwächt. Diese HDAC-Substrate sind direkt oder indirekt an verschiedenen Signalwegen wie der Genexpression oder Regulation von Proliferation, Differenzierung und Zelltod beteiligt. Dementsprechend lassen sich die Effekte der in meiner Forschungsarbeit zu untersuchenden HDACi durch multiple Regulationsmechanismen erklären (sichtbar in Abbildung 2-5). Darüber hinaus unterscheiden sich die HDAC in Expression, Lokalisation und Zielsubstraten, weshalb derselbe HDACi unterschiedliche Wirkungen in Zellkultur und dem Ursprungsgewebe entfalten kann (Xu et al. 2007, Villar-Garea und Esteller 2004).

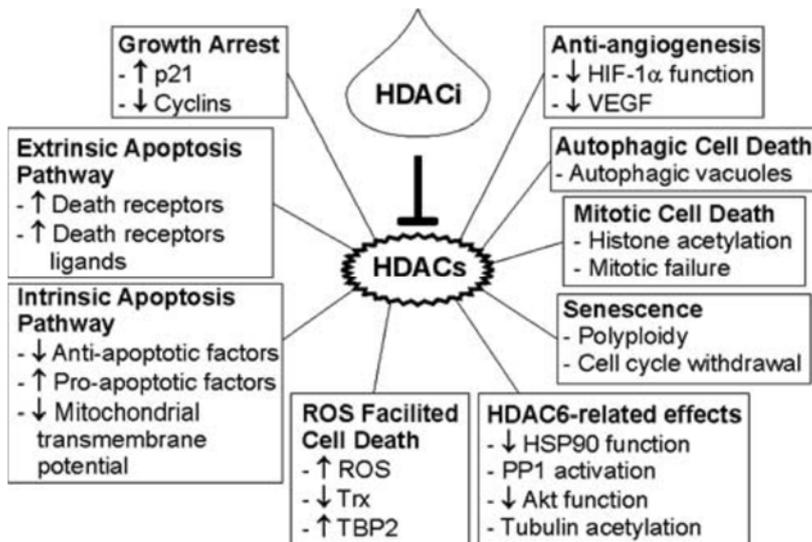


Abbildung 2-5: Schematische Darstellung der Effekte der HDACi auf verschiedene Signalwege (Xu et al. 2007)

2.4.2.3 Sirtuine

Die humane Sirtuinfamilie ist homolog zu Sir2, dem ersten entdeckten Sirtuin von der Hefespecies *Saccharomyces cerevisiae*. Hiervon leitet sich auch der Familienname der sieben humanen Isoenzyme ab. Das Sir2-Protein bewirkt eine Repression der Genexpression (Silencing) und wird mit Signalwegen in Verbindung gebracht, die die Extension der Lebensspanne und Genomstabilität beinhalten.

Zwar gehören die Sirtuine phylogenetisch zur HDAC-Familie, allerdings unterscheiden sie sich pharmakologisch und biochemisch von den übrigen Klassen. In der momentanen wissenschaftlichen Literatur werden deshalb lediglich die Isoenzyme der Klassen I, II und IV als „HDAC“ beschrieben und die „Sirtuine“ oder „SIRT“ von diesen abgegrenzt. Ein wesentlicher Unterschied besteht darin, dass Isoenzyme der Sirtuine SIRT1 bis 7 NAD⁺- abhängige Proteindeacetylasen sind. Hingegen benötigen die klassischen HDAC Zn²⁺ als Kofaktor für ihre enzymatische Aktivität (de Ruijter et al. 2003). Des Weiteren können Sirtuine im Gegensatz zu den restlichen HDAC nicht durch HDACi gehemmt werden, weshalb eine Unterteilung der Inhibitoren in „HDACi“ und „SIRTi“ in der Nomenklatur vorgenommen wurde (Rodríguez-Paredes und Esteller 2011). Die humanen Sirtuine werden entsprechend den phylogenetischen Analysen der Kerndomänen von Eukaryoten und Prokaryoten in verschiedene Klassen unterteilt. Jedes Sirtuin besitzt dabei eine katalytische Kerndomäne aus 275 Aminosäuren und einer zusätzlichen N-terminalen und/ oder

C-terminalen Sequenz von variabler Länge (Michan und Sinclair 2007, Yi und Luo 2010).

Die Sirtuine SIRT1 bis 7 unterscheiden sich hinsichtlich ihrer subzellulären Lokalisation (siehe Abbildung 2-6). SIRT1, 6 und 7 befinden sich hauptsächlich im Zellkern, wobei SIRT1 auch wichtige zytoplasmatische Funktionen aufweist. Während SIRT2 vornehmlich im Zytoplasma vorkommt, werden die SIRT3, 4 und 5 im Mitochondrium detektiert (Michan und Sinclair 2007).

SIRT1 ist das am besten untersuchte der humanen Sirtuine und beteiligt an den Signalwegen der zellulären Stressantwort. Es besitzt eine Vielzahl von Substraten wie p53, NF- κ B sowie Proteinen, die die Stressresistenz der Zelle erhöhen. Lediglich SIRT1, jedoch nicht die beiden anderen nukleären Sirtuine, zeigt eine Deacetylaseaktivität von p53 (Yi und Luo 2010, Michishita et al. 2005). SIRT1 reguliert hierbei sowohl p53-abhängige als auch – unabhängige Apoptosewege, wobei die erwähnte Deacetylierung des p53 mit einer Repression der p53-abhängigen Apoptose einhergeht (Bosch-Presegué und Vaquero 2011). Die Funktion der nukleären Sirtuine besteht vorrangig in der Adaptation von metabolischen Prozessen an die zellulären Energiebedürfnisse und hierbei vor allem der Modulation von Glukose- und Fettmetabolismus. SIRT1 besitzt weitere wichtige Funktionen, die die Regulation von Autophagie, Prävention von Inflammation sowie Formation von Heterochromatin einschließen. Die Adaptation der Zelle an einen reduzierten Energieverbrauch wird durch die mitochondrialen Sirtuine bewirkt (Morris 2013).

In jüngerer Zeit wurden die Sirtuine mit Altern und altersassoziierten Erkrankungen in Verbindung gebracht. Dabei ist bislang unklar, ob die menschlichen Sirtuine auch die replikative Lebensspanne humaner Zellen verlängern können. Eine Überexpression des humanen SIRT1 führte zu keiner Verlängerung der Überlebenszeit von Säugetieren, wobei ein Effekt der anderen Sirtuine auf die Lebenszeit nicht auszuschließen ist (Michishita et al. 2005, Morris 2013). Auch eine Assoziation der Sirtuine mit Tumorsuppression bzw. – promotion wird diskutiert. Im Gegensatz zu der bekannten Bedeutung der HDAC im Zusammenhang mit Tumorentstehung erscheint die Rolle der Sirtuine in der Kanzerogenese widersprüchlich. Einerseits wurde eine erhöhte Expression von SIRT1 in Prostata- und Kolonkarzinom sowie Nichtmelanomhautkrebs detektiert. Jedoch ist hierbei ungeklärt, ob dies eine Ursache oder Folge der Tumorigenese darstellt. Durch die direkte Interaktion von SIRT1 mit p53 und der daraus abgeschwächten Wirkung des p53 galt SIRT1

zunächst als Tumorpromotor. Allerdings wurde eine verminderte Expression in anderen Tumorarten wie beispielsweise in Blasen-, Brustkrebs und im Glioblastom nachgewiesen. Die tumorsupprimierende Wirkung des SIRT1 wurde hierbei mit der Förderung von DNA-Reparaturmechanismen und der Bewahrung der Genomintegrität in Verbindung gebracht (Deng 2009). Außerdem führt SIRT1 zur Deacetylierung des hypoxia-inducible factor 1 α (HIF-1 α), wodurch hypoxische Stressgene aktiviert und die Tumorigenese und Vaskularisierung inhibiert werden (Lim et al. 2010). Auch die restlichen Isoenzyme der Sirtuinfamilie zeigten unterschiedliche Expressionsmuster in den einzelnen Tumorentitäten. Es besteht somit eine duale Rolle der Sirtuine im Sinne einer Tumorsuppression oder-promotion jeweils abhängig von dem jeweiligen Isoenzym, der Tumorart und den Untersuchungsbedingungen. Die pharmakologische Intervention im Sinne einer Inhibition oder auch Aktivierung von Sirtuinen sollte somit in Zukunft selektiv unter Beachtung dieser Kenntnisse erfolgen (Bosch-Presegué und Vaquero 2011).

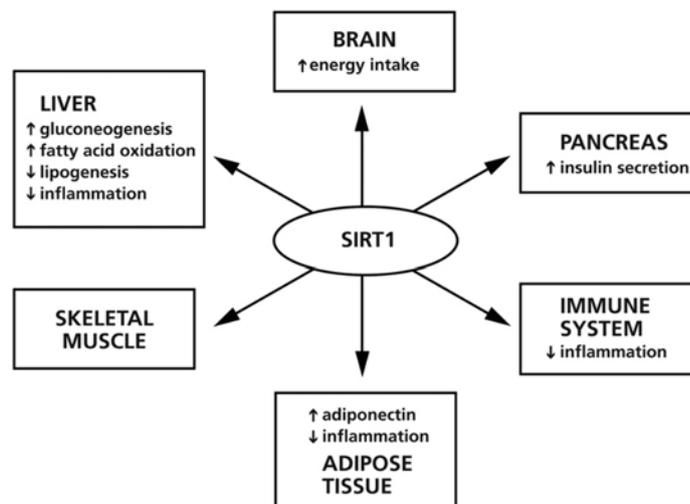


Abbildung 2-6: Darstellung der Zielgewebe und der dortigen Wirkungsweise von SIRT1 (Morris 2013)

2.5 Histondeacetylaseinhibitoren

Histondeacetylaseinhibitoren stellen eine Klasse strukturell unterschiedlicher Substanzen dar, die selektiv HDAC inhibieren können. Beispielsweise wurde in soliden Tumoren ein unbalanciertes Verhältnis von Acetylierung und Deacetylierung von Histonen beobachtet, häufig zu Gunsten von HDAC-assoziierten Faktoren. Eine verminderte Acetylierung von Histonen korreliert dabei mit einem schlechteren

klinischen Outcome. In diesem Zusammenhang und auch bei anderen Tumorentitäten stellen HDACi eine erfolgsversprechende Option als neue Chemotherapeutika dar. Einige dieser Substanzen befinden sich als Monotherapie oder Kombination in klinischen Studien bzw. sind bereits zugelassen (Minucci und Pelicci 2006, Rodríguez-Paredes und Esteller 2011).

2.5.1 Wirkungen der HDACi

HDACi entfalten zelltypspezifische antiinvasive, -angiogenetische Effekte und besitzen immunmodulatorische Aktivität, wodurch sie sich zur Hemmung von Tumorentstehung und -progression eignen. Die Inhibition der Histondeacetylierung durch die HDACi führt zu einer Hyperacetylierung und damit zu einer direkten Regulation der Genexpression. Eines der häufig von HDACi induzierten Zielgene stellt der Cyclin-dependent kinase (CDK) inhibitor p21 (WAF1/CIP1) dar. Dabei erfolgt die Induktion der Expression von p21 unabhängig von dem Tumorsuppressorprotein p53. Neben der Regulation der Genexpression durch Histondeacetylierung deacetylieren die HDACi auch Transkriptionsfaktoren (z.B. p53) und andere Nichthistonproteine (z.B. Hitzeschockproteine, α -Tubulin) und beeinflussen auf diese Weise biologische Prozesse wie Apoptose und Zellzyklusarrest. Außerdem hemmen sie die Proliferation und Differenzierung von transformierten Zellen und lösen den Zelltod aus. Letzteres beinhaltet den intrinsischen (mitochondrialen) und extrinsischen Weg der Apoptose, Autophagie, und Seneszenz. Des Weiteren können reaktive Sauerstoffspezies, auch reactive oxygen species (ROS) genannt, eine Rolle in der HDACi-getriggerten Apoptose spielen. Inwiefern die Akkumulation von ROS den Zelltod auszulösen vermag, ist noch nicht gänzlich geklärt. Es könnte allerdings Hinweise darauf geben, weshalb sich normale Zellen selektiv resistent gegenüber einer Behandlung mit HDACi verhalten (Minucci und Pelicci 2006).

Der durch HDACi ausgelöste Wachstumsstopp wird bereits bei geringen Konzentrationen, die Apoptose bei höheren Konzentrationen ausgelöst bzw. der Wachstumsarrest kann der Apoptose vorausgehen. Der ausgelöste Arrest des Zellzyklus findet bei geringen Konzentrationen in der G₁-Phase, bei hohen Konzentrationen zusätzlich noch in der G₂/M-Phase statt. Die G₁- und G₂-Arreste werden durch eine Induktion des p21 erklärt, welches unter anderem eine Hemmung der CDKs bewirkt, die die G₁-Progression und den G₁/S-Übergang regulieren. Die

Störung dieser beiden Zellzyklus-Checkpunkte bewirkt einen vorzeitigen Zelltod der Tumorzellen durch eine erfolglose Mitose und Induktion der Apoptose. Dies könnte auch die Tumorselektivität der HDACi erklären (Xu et al. 2007, Minucci und Pelicci 2006, Bolden et al. 2006).

Als weiterer Wirkmechanismus der HDACi ist die Inhibition der DNA-Reparaturmechanismen erwähnenswert, die zu einer Akkumulation von geschädigter DNA in Tumorzellen und damit zu einer möglichen Steigerung der Sensitivität gegenüber Chemo- und Radiotherapie führt.

Zum momentanen Zeitpunkt kann durch die komplexe Wirkungsweise der HDACi beruhend auf zellulären Signalwegen, transkriptionellen und nichttranskriptionellen Effekten kein Rückschluss auf einen universalen Hauptangriffspunkt gezogen werden. Weitere Studien sind nötig, um zu untersuchen, ob die Effekte lediglich zellspezifisch oder auf eine synergistische Wirkung verschiedener simultaner Signalwege zurückzuführen sind (Minucci und Pelicci 2006).

2.5.2 Substanzklassen

HDACi unterscheiden sich in ihrer chemischen Struktur und sind sowohl natürlichen als auch synthetischen Ursprungs (Tabelle 2-1). Sie weisen im Gegensatz zu den herkömmlichen Tumortherapien eine geringe Toxizität in Patienten auf. Die möglichen toxischen Wirkungen, die variierend je nach Substanzklasse der HDACi auftreten, sind eher als unspezifische Nebenwirkungen der jeweils einzelnen Substanz zu werten und nicht durch eine generelle Hemmwirkung der HDACi. Eine Optimierung der Behandlung mit HDACi wird erschwert durch die unklare Beziehung zwischen Toxizität und den pharmakokinetischen und – dynamischen Eigenschaften der Substanzen (Minucci und Pelicci 2006).

Bereits zwei HDACi haben eine Zulassung von der US Food and Drug Administration erhalten. Hierbei handelt es sich um Vorinostat und Romidepsin, die für die Behandlung des kutanen T-Zell-Lymphoms (CTCL) angewendet werden (Rodríguez-Paredes und Esteller 2011).

Gruppe	Substanz	HDAC-Spezifität	Klinische Studien
Kurzkettenige Fettsäuren	Butyrat	Klasse I, IIa	Phase I, II (ZNS-Malignome, AML, MDS, kolorektales Karzinom)
	Valproinsäure	Klasse I, IIa	Phase I, II (Leukämien, MDS, Cervixkarzinom)
Benzamide	MS-275 (Entinostat)	HDACs 1, 2, 3	Phase I, II (solide Tumoren, Leukämien, Lymphome)
	CI-994 (Tacedinalin)	-	Phase I, II (Pankreaskarzinom, multiples Myelom, NSCLC)
Zyklische Peptide	Depsipeptide (FK-228, Romidepsin)	Klasse I	Phase I, II (Leukämien, kutane T-Zell- oder periphere Lymphome)
	Apicidin	HDACs 1 and 3	-
Hydroxamsäuren	Suberoylanilide hydroxamic Acid (SAHA, Vorinostat)	Klasse I, II	Phase I, II, III (Leukämien, Lymphome, solide Tumoren) zugelassen für CTCL
	Trichostatin A (TSA)	Klasse I, II	-
Elektrophile Ketone	Trifluoromethylketon	-	-
Sonstige	Depudecin	Klasse I, unbekannter Effekt auf Klasse II	-

Tabelle 2-1: Einteilung der HDACi in Substanzklassen (modifiziert nach Bolden et al. 2006, Minucci und Pelicci 2006)

Alle HDACi besitzen eine Metall-bindende Domäne, die einen Chelatkomplex mit dem Zn-Kation im aktiven Zentrum der Klasse I und II HDAC bilden und somit das aktive Zentrum blockieren. Deshalb bleiben Sirtuine, die NAD⁺ für ihre katalytische

Aktivität benötigen, unbeeinträchtigt von den HDACi (Rodríguez-Paredes und Esteller 2011).

HDACi besitzen die Fähigkeit in Kombination mit therapeutischen Substanzen, darunter klassischen Chemotherapeutika, deren Aktivität modulieren zu können. Hierbei wurden additive und synergistische Effekte zur Verstärkung der Apoptose von Tumorzellen in vitro beobachtet. Darüber hinaus erhöhen HDACi die Effektivität von Radiotherapie bzw. mildern deren Toxizität. Die beteiligten Wirkmechanismen sind noch nicht gänzlich aufgeklärt und es bedarf zukünftiger In-vivo-Studien, um eine akkumulierende Toxizität im Gesamtorganismus auszuschließen (Drummond et al. 2005).

2.5.3 SAHA

Suberoylanilide hydroxamic Acid (SAHA), auch Vorinostat genannt, gehört zur Substanzklasse der Hydroxamsäuren (siehe Abbildung 2-7). In präklinischen Studien führte SAHA zu einer Akkumulation von acetylierten Histonen und löste Zellzyklusarrest und Apoptose aus. Antineoplastische Aktivität entfaltet es in vivo in soliden Tumoren, Leukämie und Lymphomen. Es bewirkt eine Inhibition der Klasse I und II HDAC durch die Blockierung deren aktiven Zentren (Duvic und Vu 2007). Seit 2006 wurde SAHA in den USA zur Therapie der kutanen Manifestation von Patienten mit progressivem, persistierendem oder rekurrendem kutanen T-Zelllymphom zugelassen. SAHA zeigte sich hierbei als potenter Inhibitor der HDAC, der sowohl in oraler als auch intravenöser Applikation gut toleriert wird (Mann et al. 2007). Ansprechraten von 30 % konnten mithilfe dieses HDACi erreicht werden, was den Ansprechraten anderer Tumorthapien entspricht. Dosislimitierende Nebenwirkungen beinhalten Fatigue, gastrointestinale Beschwerden und Myelosuppression (Mann et al. 2007).

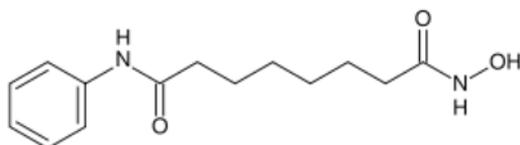


Abbildung 2-7: Strukturformel von SAHA (Duvic und Vu 2007)

2.5.4 MS-275

MS-275 ist ein synthetisches Benzamid-Derivat (Abbildung 2-8), das einen weiteren HDACi mit antiproliferativer Aktivität darstellt (Ryan et al. 2005, Jaboin et al. 2002). Weitere Bezeichnungen für MS-275 sind Entinostat bzw. SNDX-275. MS-275 zeigte sich wirksam *in vitro* und *in vivo* bei einer Vielzahl von Tumoren wie Pankreas-, Brustkrebs und einer Reihe kindlicher solider Tumoren, darunter auch dem Ewing Sarkom (Jona et al. 2011, Jaboin et al. 2002, Sonnemann et al. 2007). Hierbei trat eine Hemmung der DNA-Synthese auf.

Neben der generellen Induktion von antiproliferativen Genen, wie p21, wurden auch Auswirkungen auf den Zellzyklus beobachtet. Im Gegensatz zu Tumoren bei Erwachsenen, bei denen sich ein G₁-Arrest einstellte, war diese Wirkung von MS-275 abhängig von der jeweiligen pädiatrischen Tumorentität. In einigen kindlichen Tumoren zeigt sich ein Arrest in der G₁- und G₂-Phase des Zellzyklus, in anderen hingegen wurde die Apoptose ausgelöst. Im besonderen Fall des Ewing-Sarkoms führt die charakteristische t(11;22)-Translokation zu einem chimären EWS/FLI-1-Transkriptionsfaktor und damit zu einer supprimierten Transkription des transforming growth factor (TGF)- β -II-Rezeptor, einem Tumorsuppressorgen. MS-275 kann die TGF- β -Funktion durch eine verstärkte Expression der TGF- β RII-mRNA wieder herstellen (Jaboin et al. 2002). Durch die Wiederherstellung des TGF- β -Signalweges zeigte sich im Tierversuch eine Hemmung des Wachstums der Ewing-Sarkom-Tumorzellen (Hahm et al. 1999).

MS-275 erwies sich in der Phase I klinischer Studien für fortgeschrittene solide Tumore und Lymphome wirksam. Bei geringer Dosierung zeigten sich milde Nebenwirkungen wie Nausea, Erbrechen und Fatigue. Als dosislimitierende Nebenwirkungen zeigten sich abdominale Beschwerden, kardiale Arrhythmien, Hypotension sowie erhöhte Leberwerte. Eine Knochenmarkssuppression wurde lediglich bei einer Kumulation beobachtet (Ryan et al. 2005). Nach Slingerland et al. 2013 zeigte sich in Phase II-Studien ein optimales Dosisschema von 4 mg/m² wöchentlich für drei Wochen oder 2–6 mg/m² einmal jede weitere Woche.

Nach Jona et al. 2011 bewirkt MS-275 eine vermehrte Acetylierung von Histon H3, eine verstärkte Aktivierung des (mitochondrialen) intrinsischen Weges der Apoptose sowie eine verminderte Expression der antiapoptotischen Proteine Bcl-2 und Bcl-xL in Hodgkin-Lymphom-Zellen. Die vorangegangenen Arbeiten der Arbeitsgruppe von Professor Beck bestätigten ebenfalls die Aktivierung des mitochondrialen Weges der

Apoptose und darüber hinaus eine Induktion der Caspase-9 und -3 durch MS-275 (Sonnemann et al. 2007).

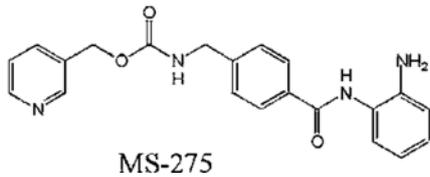


Abbildung 2-8: Strukturformel von MS-275 (Drummond et al. 2005)

2.6 Tenovin-1

Tenovin-1 ist ein kleinmolekularer Inhibitor der Sirtuine SIRT1 und SIRT2 (Strukturformel siehe Abbildung 2-9). Die Acetylierung und Aktivierung des Tumorsuppressorsproteins p53 erfolgt hierbei vor allem durch die Hemmung von SIRT1. Bereits in mikromolaren Konzentrationen führt Tenovin-1 zu Zellzyklusarrest und Zelltod in vitro und in vivo (Lain et al. 2008). Sowohl die Menge an p53 als auch dessen Zielproteine wie das p21-Protein und dessen mRNA wurden nach Behandlung mit Tenovin-1 vermehrt nachgewiesen. Scheinbar schützt Tenovin-1 p53 vor einem MDM2-medierten Abbau, da es bei Koexpression beider Proteine den p53-Gehalt erhöht (Lain et al. 2008). Mouse double minute 2 homolog (MDM2) stellt einen wichtigen Negativregulator des p53 dar. Des Weiteren wurde eine vermehrte Acetylierung des Zytoskelettbestandteils α -Tubulin durch die Inhibition des zytoplasmatischen SIRT2 beobachtet (Lain et al. 2008).

Eine zukünftige Verwendung von Tenovin-1 in vivo wird allerdings durch dessen schlechte Wasserlöslichkeit limitiert. Tenovin-6 stellt eine Weiterentwicklung mit einer sechsfach höheren Wasserlöslichkeit dar. Insgesamt bieten die Tenovine im Vergleich zu den momentanen Chemotherapeutika eine sicherere, mildere Alternative, da sie keinen DNA-Schaden verursachen (Lain et al. 2008).

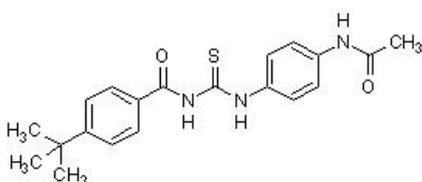


Abbildung 2-9: Strukturformel von Tenovin-1 (Abcam Biochemicals 2013)

2.7 Familie der Tumorsuppressorproteine um p53

p53 gehört zu einer kleinen Familie von evolutionär konservierten Transkriptionsfaktoren, die als weitere homologe Mitglieder p73 und p63 beinhaltet. Diese Familie von Transkriptionsfaktoren besitzt gemeinsame Zielgene, die maßgeblich Zellzyklus und Apoptose beeinflussen (Levrero et al. 2000). Vermutlich stammt das gut untersuchte p53 von den evolutionär älteren Familienmitgliedern p63 und p73 ab (Yang et al. 2002). Die Mitglieder weisen eine hohe Sequenzhomologie, vor allem im Bereich der DNA-Bindedomäne und eine starke Konservierung der funktionellen Bereiche auf (Lunghi et al. 2009, Yang et al. 2002). So besitzt p73 die selben charakteristischen Domänen, die auch p53 auszeichnen (Yang et al. 2002). In den folgenden Abschnitten wird auf die Tumorsuppressoren p53 und p73 genauer eingegangen, da sie einen zentralen Stellenwert in der Fragestellung dieser Forschungsarbeit besitzen.

2.7.1 p53

p53 ist als „Wächter des Genoms“ eines der wichtigsten Tumorsuppressoren und eine der am häufigsten genetisch alterierten Stellen in humanen Malignomen (Neilsen et al. 2011). Zu seinen Funktionen zählen die Regulation von Metabolismus, Fertilität, Entwicklung und Differenzierung (Vousden und Prives 2009). Die Regulation der Expression von Genen, die an Zellzykluskontrolle und Apoptose beteiligt sind, stellt jedoch die Schlüsselfunktion dar. Als Antwort auf Stresssignale wie genotoxische Schäden, Onkogenaktivierung oder Hypoxie verhindert p53, dass geschädigte DNA repliziert wird (Arrowsmith 1999). Einer der Schlüsselmediatoren in diesem Zusammenhang ist p53-upregulated modulator of apoptosis (PUMA), ein proapoptotisches Protein, welches durch die Aktivierung des mitochondrialen Signalweges die Apoptose auszulösen vermag. Es fördert durch die Aktivierung der Proteine Bax und Bak die Permeabilisierung der äußeren Mitochondrienmembran und damit die Freisetzung apoptotischer Moleküle (Meier und Vousden 2007, Vousden und Prives 2009).

p53-Mutationen werden bei circa der Hälfte der Tumoren nachgewiesen, wobei das Protein zumeist seine gesamte Aktivität verliert. Diese Veränderungen treten bei Malignomen im Kindesalter selten auf. p53-Mutationen wurden nach einer Metaanalyse lediglich bei 10% der Patienten mit primären und metastasierten Ewing-Tumoren beschrieben (Neilsen et al. 2011). Jedoch weisen die Patienten mit diesen

Alterationen des p53 eine schlechte Antwort auf Behandlung mit Chemotherapeutika auf (de Alava et al. 2000).

In einigen Tumoren treten p53-Mutationen auf, bei denen p53 selektiv die Fähigkeit zur Auslösung der Apoptose verloren hat, jedoch weiterhin den Zellzyklus zu arretieren vermag. Erstaunlicherweise blieben Mäuse mit solchen Mutationen in Tierversuchen gut gegen frühzeitige Tumorentstehung geschützt, was weitere Mechanismen des p53 zur Suppression der Tumorigenese nahelegt (Liu et al. 2004). Hierbei spielt die Hemmung der Zellproliferation und des – wachstums durch die Blockierung des Zellzyklus eine entscheidende Rolle. p53 aktiviert die Transkription des p21, woraus zunächst ein temporärer G₁-Arrest resultiert. Da der transiente Zellzyklusarrest einer Tumorzelle riskant wäre, kann p53 eine irreversible Blockierung des Zellzyklus, auch Seneszenz genannt, auslösen. Dies wird durch die Expression einer Vielzahl von Proteinen, wie dem plasminogen activator inhibitor 1 (PAI-1), aber hauptsächlich p21 mediiert. In vivo Studien belegen, dass durch eine ständige Beteiligung des Immunsystems im Fall der Seneszenz sogar eine Tumorbeseitigung möglich wurde (Vousden und Prives 2009).

Der Vielfalt von Funktionen des p53 folgt auch ein komplexes Regulationsnetzwerk. Neben der stressinduzierten Phosphorylierung oder Acetylierung von p53 wird das Protein auch durch die Interaktion mit Bindepartnern in seiner Funktion beeinflusst. Beispielsweise sind wichtige Negativregulatoren MDM2 und MDMX. Das bereits erwähnte MDM2, eine E3 Ubiquitin-protein-Ligase, vermag die Transkription des p53 zu hemmen. Andererseits vermindert es die Acetylierung des p53 unter anderem durch die Rekrutierung von HDAC1 (Vousden und Prives 2009).

2.7.2 p73

p73 ist es durch die strukturell ähnliche Ausstattung möglich, eine p53-ähnliche Aktivität zu entfalten, indem es an p53-typische Bindestellen angreift und dadurch p53-Zielgene aktiviert (Yang et al. 2002). Allerdings werden hierbei nur bestimmte Zielgene, wie beispielsweise p21 und MDM2, und nicht alle p53-spezifischen Zielgene aktiviert. p73 induziert auch die Apoptose und den Zellzyklusarrest in der G₁- und G₂-M-Phase ähnlich dem p53 (Zhu et al. 1998).

Das p73-Gen befindet sich auf dem Chromosom 1p36.1. Diese chromosomale Region weist bei bestimmten Tumorarten, wie dem Neuroblastom und Brustkrebs, Deletionen auf (Kaghad et al. 1997, Genuardi et al. 1989). Es lag deshalb die

Vermutung nahe, dass p73 ein Tumorsuppressorprotein sei. Die ursprüngliche Funktion in Vertebraten wird jedoch vornehmlich mit Signalwegen im Bereich der Infektionsabwehr und Neurogenese assoziiert (Yang et al. 2002).

Durch alternatives Splicing entstehen in normalen Zellen die sechs verschiedenen Isoformen des p73 α bis ζ (Kaghad et al. 1997), die sich in ihrer biologischen Aktivität unterscheiden (Arrowsmith 1999, Levrero et al. 2000). Zusätzliche Isoformen konnten in Krebszellen detektiert werden. Jede der Isoformen kann eine Transaktivierungsdomäne enthalten (TAp73) oder nicht (delta N-Form) (Levrero et al. 2000). Hierbei können lediglich die TAp73-Formen eine p53-ähnliche Funktion ausüben und den Zelltod auslösen, da sie durch die vorhandene Transaktivierungsdomäne p53-Zielgene induzieren können. Hingegen fehlt den delta N-Formen nicht nur die Fähigkeit zur Transaktivierung, sondern darüber hinaus scheinen sie auch als dominant negative Inhibitoren der p53-Funktion zu agieren (Levrero et al. 2000).

Durch die individuelle Oligomerisationsdomäne ist es dem p73 möglich, stabile Homotetramere auszubilden. Dabei kann eine Heterooligomerisation zwischen p63 und p73 ausgebildet werden, allerdings keine Assoziation zwischen p73 und p53, obwohl beide eine ähnliche Struktur aufweisen (Davison et al. 1999). Jedoch kann mutiertes p53 (mtp53), aber kein Wildtyp-p53, mit p73 interagieren und dadurch die proapoptische Aktivität des p73 reduzieren. Außerdem wird dadurch die transkriptionelle Funktion der p73-Isoformen α und β verhindert. Vermutlich entsteht diese Interaktion zwischen mtp53 und p73 nicht durch die Oligomerisationsdomäne (Davison et al. 1999). Gaiddon et al. 2001 berichten, dass eine direkte Interaktion zwischen der Kerndomäne des mutierten p53 und mehreren verschiedenen Isoformen (α , β , γ , δ) des p73 in Tumorzellen stattfindet. Da Mutationen des p53 die häufigste genetische Veränderung in humanen Tumorzellen darstellen (Hollstein et al. 1991) und die negative Interaktion zwischen p53 und p73 die transkriptionelle und apoptotische Funktion des p73 abschwächt, erscheint eine therapeutische Intervention sinnvoll. Hierbei ist ein Wiederherstellen der Tumorsuppressoraktivität des p73, wie es durch RETRA erreicht wird, eine mögliche Strategie, um den Zelltod von Tumorzellen induzieren zu können.

2.8 p73-Aktivator RETRA

Der Substanzname RETRA steht für „Reactivation of transcriptional reporter activity“. Die IUPAC-Bezeichnung dieses niedermolekularen Wirkstoffs lautet 2-(4,5-Dihydro-1,3-Thiazol-2-ylthio)-1-(3,4-Dihydroxyphenyl)-Ethanonhydrobromid (dargestellt in Abbildung 2-10). RETRA inhibiert die Interaktion zwischen mtp53 und p73, wodurch das freie p73 seine Tumorsuppressoraktivität entfalten kann (Kravchenko et al. 2008). Die genaue Angriffsstelle dieses Moleküls ist jedoch noch nicht bekannt. Vermutet wird eine direkte Interaktion mit dem mtp53/p73-Komplex, verschiedenen delta N-Isoformen des p73 oder sogar ein Einfluss modulierender Faktoren (Sullivan et al. 2007).

Nach Kravchenko et al. 2008 entfaltet RETRA seine Aktivität lediglich in Zellen mit mtp53, aber nicht in p53-Null- und p53-Wildtypzellen. Hierbei werden p53-relevante Zielgene, wie p21 and PUMA aktiviert. Die Tumorsuppressoren p53 und p73 besitzen, wie bereits erwähnt, gemeinsame spezifische DNA-Bindungselemente und Zielgene. Die Wirkung von RETRA kann deshalb durch eine transkriptionelle Aktivierung der p53-Zielgene durch eine Induktion von p73 erklärt werden (Zhu et al. 1998, Yang et al. 2002). Um die RETRA-Wirkung noch zu verstärken, wurde diese Substanz in der vorliegenden Forschungsarbeit mit verschiedenen HDACi kombiniert.

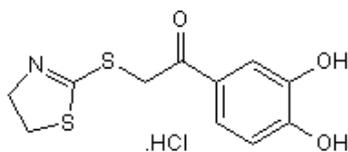


Abbildung 2-10: Strukturformel von RETRA (Tocris Bioscience 2012)

2.9 Zelltod

Die molekulare Grundlage des Zelltodes besitzt einen großen Stellenwert für das Verständnis von Entstehung und Resistenzentwicklung von Malignomen. Ein entscheidendes Kennzeichen von Tumoren ist die Fähigkeit physiologische Zelltodmechanismen zu überwinden und resistent gegenüber wachstumshemmenden Signalen sowie antineoplastischen Pharmaka zu werden (Hanahan und Weinberg 2000).

Heute sind verschiedene Arten des Zelltodes bekannt, die sich durch ihre Interaktion mit Komponenten des Immunsystems unterscheiden. Wichtig sind in diesem Rahmen besonders Apoptose, Autophagie und Nekrose. Apoptose und Autophagie werden als aktive Prozesse angesehen, da deren molekulare Signalwege neben der Morphologie auch das weitere Schicksal der Zelle bestimmen. Die Apoptose wird in diesem Zusammenhang als programmierter Zelltod bezeichnet, da sie in einem geregelten Rahmen abläuft. Hingegen löst ein Zellschaden, der ein weiteres Überleben der Zelle ausschließt, vor allem die Nekrose aus (Green 2011).

2.9.1 Apoptose

Der Begriff der Apoptose wurde 1972 von dem Pathologen John Kerr geprägt und entspricht in seiner griechischen Wortbedeutung dem Fallen von Blättern oder Blüten. Dieser energieabhängige Prozess tritt unter physiologischen Bedingungen wie Embryonalentwicklung, Immunabwehr und Gewebemöostase auf. Die Apoptose als Form des programmierten Zelltodes gewährleistet im Zusammenspiel mit der konträren Mitose die Regulation der Zellpopulation. Pathologische Veränderungen der Apoptose führen zur Entstehung von neurodegenerativen Erkrankungen, Autoimmunität und Neoplasien (Kerr et al. 1972, Green 201, Okada und Mak 2004, Meier und Voudsen 2007).

Zwei verschiedene Signalwege der Apoptose, der „extrinsische“ und „intrinsische“ Weg, werden unterschieden (siehe Abbildung 2-11). Der „extrinsische“ Weg wird durch Immunsignale mediiert, während der „intrinsische“ Weg durch zellulären Stress und Entwicklungssignale induzierbar ist. Die Auslösung der Signalkaskade des extrinsischen Weges erfolgt durch spezifische Todesrezeptoren an der Zelloberfläche. Hingegen beruht der intrinsische Weg auf einer Permeabilisierung der mitochondrialen Membran, wodurch proapoptische Proteine aus dem Intermembranraum ins Zytoplasma gelangen können. Beide Apoptosemechanismen führen zur Aktivierung von Caspasen, einer hochkonservierten Familie von Cystein-Proteasen. Diese Enzyme spalten Substrate spezifisch nach Aspartatbindungen. Es werden nach der Funktion Initiator- und Effektorcaspasen unterschieden. In der Zelle liegen Vorläuferformen, die Procaspasen, vor. Die sogenannten Initiatorcaspasen werden durch Protein-Protein-Interaktion aktiviert und spalten wiederum proteolytisch weitere Caspasen in der Kaskade, die Effektorcaspasen. Letztere mediierten das

eigentliche Apoptoseprogramm in der sterbenden Zelle (Hengartner 2000, Meier und Vousden 2007, Enari et al. 1998).

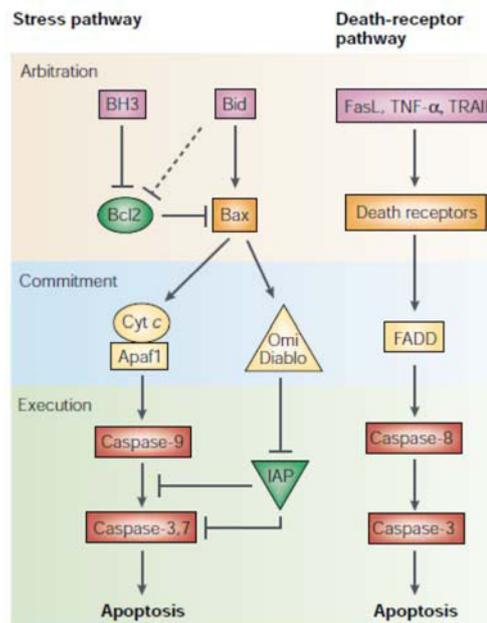


Abbildung 2-11: Gegenüberstellung der Signalwege der Apoptose. Links der intrinsische (mitochondriale) und rechts der extrinsische (Todesrezeptor-vermittelte) Weg (Cory und Adams 2002)

Der grundsätzliche Ablauf der Apoptose geht mit einem typischen morphologischen Umbau der Zelle einher. Der Tod betrifft in der Regel Einzelzellen, da in der ersten Phase der Apoptose die Kontakte zu Nachbarzellen aufgelöst werden. Zunächst schrumpft die Zelle, indem das Chromatin des Zellkerns und das Zytoplasma kondensieren. Die DNA wird durch aktivierte Endonukleasen in Fragmente mit einer Länge von 185 Basenpaaren gespalten, die in der Elektrophorese ein kennzeichnendes leiterartiges Muster (DNA Laddering) ergeben (Rueda et al. 1995). Die restlichen Zellorganellen bleiben jedoch intakt. Im weiteren Verlauf stülpt sich die Plasmamembran aus und die Zelle verpackt ihre Organellen und Fragmente des Zellkerns in sogenannten Apoptosekörperchen. Durch die Verlagerung von Signalmolekülen wie Phosphatidylserinresten auf die Außenseite der Zellmembran werden die Oberflächeneigenschaften der Zelle so verändert, dass eine schnelle Phagozytose der membranumschlossenen Partikel von Makrophagen oder Nachbarzellen erfolgen kann. Es bleibt hierbei im Gegensatz zur Nekrose eine

umgebende Entzündungsreaktion aus (Kerr 1972, Fadeel und Orrenius 2005, Cho und Choi 2002).

2.9.1.1 Intrinsischer Weg

Der intrinsische Weg der Apoptose wird sowohl durch extra- als auch intrazelluläre Stresssignale, wie beispielsweise Hypoxie, Entzug von Wachstumsfaktoren und DNA-Schäden ausgelöst. Hierdurch wird die Permeabilität der äußeren Mitochondrienmembran erhöht und proapoptotische Faktoren ins Zytosol freigesetzt. Diese aus dem mitochondrialen Intermembranraum entlassenen Moleküle beinhalten apoptosis-inducing factor (AIF), second mitochondria-derived activator of caspases (Smac/DIABLO), high temperature requirement protein A2 (Omi/HtrA2), Endonuklease G (EndoG) und Cytochrom c (cyt-c). Das freigesetzte cyt-c bewirkt in Anwesenheit von Desoxyadenosintriphosphat (dATP) oder Adenosintriphosphat (ATP) die Oligomerisierung des Adaptormoleküls apoptotic protease activation factor-1 (Apaf-1). Apaf-1 liegt normalerweise in monomerer Form im Zytoplasma vor. Das aktivierte Apaf-1 bildet zusammen mit cyt-c, ATP und der Procaspase-9 einen multimeren Komplex, das Apoptosom. Die Interaktion zwischen Apaf-1 und der Procaspase-9 entsteht durch eine Caspase-Rekrutierungsdomäne (caspase recruitment domain, CARD), die ein Bestandteil beider beteiligten Proteine darstellt. Das Apoptosom führt zur Aktivierung der Initiatorcaspase-9, die wiederum die Procaspasen-3 und -7 spaltet. Diese nun aktivierten Effektorcaspasen-3 und -7 medieren die proteolytische Zerstörung der Zelle (Cory und Adams 2002, Okada und Mak 2004, Fadeel und Orrenius 2005).

Der mitochondriale Signalweg wird durch die B-cell lymphoma 2 (Bcl-2)-Proteinfamilie reguliert. Zu dieser Familie gehören 20 Mitglieder, die durch mindestens eine konservierte Bcl-2 homology-Domäne charakterisiert sind. Des Weiteren befinden sich darunter fünf antiapoptotische Proteine, Bcl-2, Bcl-xL, Bcl-w, Mcl-1 und BCL2A1, und zwei Gruppen von proapoptotischen Faktoren, zum einen Bax und Bak, zum anderen die BH3-only-Proteine (Cory und Adams 2002). Der intrinsische Weg wird eingeleitet, indem die BH3-only-Proteine die Oligomerisierung von Bax und Bak induzieren und dadurch proapoptotische Moleküle wie cyt-c aus dem Mitochondrium freigesetzt werden.

Die BH3-only-Proteine nehmen eine Schlüsselrolle in der Aktivierung der Apoptose ein. Wahrscheinlich binden die BH3-only-Proteine an Bcl-2-Proteine und führen somit

zur Freisetzung von Bax und Bak oder sie aktivieren direkt Bax und Bak. Eine genaue Klärung des Wirkmechanismus bedarf weiterer Forschungsarbeit. Normalerweise werden BH3-only-Proteine, darunter Bim, Bid, Puma, Bad, Noxa, Bmf und Bik, in gesunden Zellen nicht exprimiert bzw. sind an das Zytoskelett gebunden. Durch zellulären Stress werden sie aktiviert bzw. freigesetzt. Hierbei werden unterschiedliche BH3-only-Proteine durch spezifische Stresssignale induziert. Beispielsweise führt ein DNA-Schaden zur p53-medierten Induzierung von Noxa und Puma (Cory und Adams 2002, Meier und Vousden 2007).

Zusätzlich zu cyt-c werden andere proapoptotische Moleküle aus dem Mitochondrium freigesetzt, wie Smac/DIABLO und Omi/HtrA2, die an Inhibitoren der Apoptose (inhibitors of apoptosis, IAP) binden. IAPs binden mit ihrer BIR-Domäne (baculovirus IAP repeat) an das aktive Zentrum von Caspasen und inhibieren diese dadurch. Auch die IAP-Antagonisten (Smac/DIABLO und Omi/HtrA2) befinden sich normalerweise in Mitochondrien oder dem Endoplasmatischem Retikulum und werden erst durch Todessignale freigesetzt. Die auch aus dem Mitochondrium entlassenen Moleküle AIF und Endo G führen zur Caspase-unabhängigen Fragmentierung der DNA (Cory und Adams 2002, Meier und Vousden 2007).

2.9.1.2 Extrinsischer Weg

Die Aktivierung des extrinsischen Signalweges der Apoptose erfolgt durch die Ligation von membranständigen Todesrezeptoren der Tumor necrosis-factor receptor (TNFR) Superfamilie. Erwähnenswert sind hierbei beispielsweise TNFR, FasR, death receptor 3 und 4 (DR3 und DR4) (Green 2011, Cho und Choi 2002). Die Todesrezeptoren sind als transmembranäre Signaltransduktoren Teil einer komplexen Kaskade, die über Adaptorproteine zur Aktivierung der Caspase-8 und -10 führt (Ashkenazi 2002).

In diesem Zusammenhang sind Fas ligand (FasL) und tumor necrosis factor-2 (TNF-2) als wichtige Todessignale zu nennen. Durch die Bindung von FasL an die Rezeptoren FasR, DR4 und DR5 kommt es zur Rekrutierung und Aggregation des Adaptormoleküls Fas-associated death domain (FADD). Dadurch wird die Todeseffektordomäne (death effector domain, DED) von FADD freigelegt. Es kommt zur Interaktion der DED von FADD und der DED der Prodomäne der Procaspase-8. Diese Interaktion mediiert die Oligomerisation der Procaspase-8 auf der zytoplasmatischen Seite der Plasmamembran. Ein großer Molekülkomplex, der

sogenannte Zelltod-induzierende Komplex (death-inducing signal complex, DISC), wird gebildet, und es erfolgt hier die Autoaktivierung zur Caspase-8 (Enari et al. 1998, Hengartner 2000).

Es besteht eine Schnittstelle zum mitochondrialen Signalweg der Apoptose. Einerseits kann die Aktivierung der Caspase-3 durch die, bereits im intrinsischen Weg beschriebenen, IAP-Proteine gehemmt werden. Andererseits kann Bid, ein proapoptotisches Protein der Bcl-2-Familie, von der Caspase-8 in seine funktionsfähige Form tBid überführt werden. tBid aktiviert den intrinsischen Weg, indem es cyt-c, AIF und weitere Proteine aus dem Mitochondrium ins Zytosol entlässt (Fan et al. 2005, Ashkenazi 2002, Hengartner 2000). Im weiteren Verlauf folgt die Bildung des Apoptosoms und die Aktivierung der Caspase-9 über Apaf-1 (dargestellt in Abbildung 2-12) (Hengartner 2000, Cho und Choi 2002).

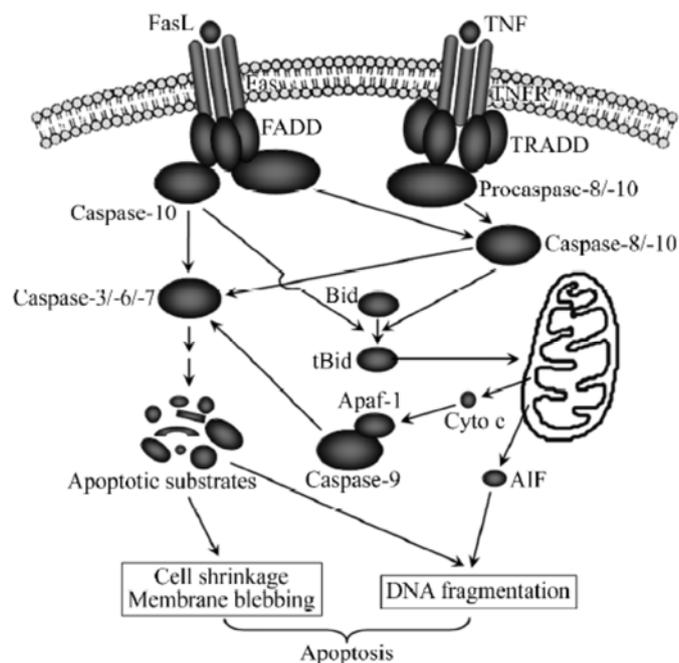


Abbildung 2-12: Darstellung der Signalwege der Todesrezeptoren Fas und TNFR und Verbindung zum intrinsischen Signalweg (Fan et al. 2005)

3. Zielstellung der Arbeit

In der Arbeitsgruppe von Professor Beck wurde durch den Wirkstoff Nutlin-3 die Aktivierung von p53 und damit erfolgreich der Zelltod in Ewing-Sarkom-Zellen mit Wildtyp-p53 ausgelöst. In Zellen mit mtp53 war Nutlin-3 dagegen wirkungslos, jedoch könnte in diesen Zellen die Aktivierung von p73 antineoplastisch wirken. Deshalb schlossen sich Versuche mit dem p73-Aktivator RETRA an. Erstaunlicherweise konnte die zytotoxische Wirkung von RETRA nicht nur in mtp53-Zellen, wie von Kravchenko et al. 2008 beobachtet, sondern auch in Null- und Wildtyp-p53-Zellen nachgewiesen werden. Die Wirksamkeit von RETRA ist demnach nicht strikt von p53 abhängig.

An diese Ergebnisse schließt sich die vorliegende Forschungsarbeit an, bei der die Wirkungsweise der HDACi und eines SIRTi allein bzw. in Kombination mit RETRA untersucht werden sollte. Durch die Verwendung der Ewing-Sarkom-Zellen mit mutiertem, Null- und Wildtyp-p53 konnte eine Aussage zur Abhängigkeit der verwendeten Substanzen von der Funktionsfähigkeit der Tumorsuppressoren p53 und p73 getroffen werden. Die HDACi SAHA (Vorinostat) und MS-275 wurden verwendet. Als SIRTi diente Tenovin-1. Die Verstärkung des RETRA-induzierten Zelltodes durch die HDACi bzw. den SIRTi Tenovin-1 wurde mithilfe verschiedener Methoden zur Überprüfung des Zelltodes untersucht. Diese beinhalteten zytofluorometrische Messungen sowie die Caspase-3-Aktivitätstestung. Außerdem wurden Genexpressionsanalysen mittels „Real time“ Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) durchgeführt, bei denen die Expression von p21 bestimmt wurde. p21 als Zellzyklusregulator stellt ein Zielgen sowohl von dem Tumorsuppressorprotein p53 als auch p73 dar und ermöglicht in diesem Zusammenhang eine Aufklärung der molekularen Wirkmechanismen der verwendeten Substanzen.

4. Material und Methoden

4.1 Material

4.1.1 Zelllinien

<i>Zelllinie</i>	<i>Charakterisierung/- Herkunft</i>
<u>SK-ES1</u>	Ewing Sarkom, p53-Mutation, etabliert seit 1972
Morphologie:	adhärente, epitheliale Zellen
Medium:	RPMI 1640 500 ml
	FKS 10%
	Penicillin G 100 units pro ml
	Streptomycin 0,1 mg/ml
Inkubation:	bei 37°C, 5% CO ₂
Herkunft:	DSMZ, Braunschweig, Deutschland
Besonderheit:	Kultivierung in kollagen-beschichteten Kulturflaschen
<u>SK-N-MC</u>	Ewing-Sarkom, Null-p53, FLI1-EWS Genfusion, etabliert seit 1971
Morphologie:	adhärente, neuroepitheliale Zellen
Medium:	DMEM low glucose 500 ml
	FKS 10%
	Stabiles Glutamin 1%
	MEM Non essential
	Amino acids (NEAA) 1%
	Penicillin G 100 units pro ml
	Streptomycin 0,1 mg/ml
Inkubation:	bei 37°C, 5% CO ₂
Herkunft:	DSMZ, Braunschweig, Deutschland
Besonderheit:	Kultivierung in kollagen-beschichteten Kulturflaschen, morphologische Verwandtschaft zum Ewing Sarkom
<u>CADO-ES1</u>	Ewing-Sarkom, p53-Wildtyp, ohne Caspase-8-Expression, etabliert seit 1991
Morphologie:	semi-adhärente, epitheliale Zellen

Medium: RPMI 1640 500 ml
 FKS 10%
 Penicillin G 100 units pro ml
 Streptomycin 0,1 mg/ml
 Inkubation: bei 37°C, 5% CO₂
 Herkunft: DSMZ, Braunschweig, Deutschland
 Besonderheiten: Kultivierung in kollagen-beschichteten Kulturflaschen,
 Temperaturempfindlichkeit

RD-ES humanes Ewing-Sarkom, p53-Mutation, etabliert seit 1984
 Morphologie: adhärenzte Zellen, die teilweise in Clustern wachsen
 Medium: RPMI 1640 500 ml
 FKS 10%
 Penicillin G 100 units pro ml
 Streptomycin 0,1 mg/ml
 Inkubation: bei 37°C, 5% CO₂
 Herkunft: DSMZ, Braunschweig, Deutschland
 Besonderheiten: Wachstum nur in kollagen-beschichteten Kulturflaschen

WE-68 humanes Ewing-Sarkom, p53-Wildtyp, etabliert seit 1987
 Morphologie: adhärenzte Zellen
 Medium: RPMI 1640 500 ml
 FKS 10%
 Penicillin G 100 units pro ml
 Streptomycin 0,1 mg/ml
 Inkubation: bei 37°C, 5% CO₂
 Herkunft: Dr. F. van Valen, Labor für experimentelle Orthopädie,
 Münster, Deutschland
 Besonderheiten: Wachstum nur in kollagen-beschichteten Kulturflaschen

4.1.2 Zellkulturbedarf

Die verwendeten Materialien und Reagenzien wurden über die Universitätsapotheke der Kinderklinik Jena bestellt.

Im Folgenden sind die verwendeten Materialien mit den zugehörigen Herstellern angegeben:

DMEM low Glucose	PAA
Dulbecco's Phosphate Buffered Saline (PBS)	PAA
Essigsäure Rotipuran 100%	Roth
Ethylendiamintetraacetat (EDTA)	Sigma- Aldrich
Foetal Bovine Serum	PAA
Lyophilisat aus Rattenschwanzkollagen	Roche
MEM NEAA	PAA
Penicillin G	PAA
RPMI 1640	PAA
Stabiles Glutamin	PAA
Streptomycin-Sulfat	PAA
Trypanblau	Biochrom AG
Trypsin	PAA

4.1.3 Chemikalien und Reagenzien

Aqua dest.	B.Braun
BD FACST TM	BD Biosciences
BD FACST TM Clean Solution	BD Biosciences
BD FACST TM Shutdown Solution	BD Biosciences
BD TM Cytometer setup and tracking Beads	BD Biosciences
Caspase- Lysepuffer (pH 7.5)	eigene Arbeitsgruppe
Caspase-3-Substrat	Bachem
Dithiothreitol (DTT)	Bio-Rad Laboratories
DMSO (Dimethylsulfoxid)	Roth
Ethanol (99.8%) Rotipuran	Roth
Glucose	Roth
Glycerin	Merck
Hepes	Sigma- Aldrich

MS-275	Alexis Biochemicals
RETRA hydrochloride	Tocris Bioscience
RNase A	Roche
SAHA	Alexis Biochemicals
Tenovin-1	Cayman Chemicals
Triton X-100	Sigma-Aldrich

4.1.4 Fluoreszenzfarbstoffe

3,3'-Dihexyloxycarbocyanin Jodid (DIOC ₆)	Molecular Probes
Propidiumjodid	Sigma- Aldrich

4.1.5 Reagenzien für die mRNA-Expressionsanalyse

4.1.5.1 Primer-Sonden-Mixe	
Human β 2M (20x)	Applied Biosystems
TaqMan® Gene Expression Assay p21	Applied Biosystems
4.1.5.2 Kits und andere Reagenzien	
Aqua ad iniectabilia Braun	B. Braun Melsungen AG
Omniscript® RT Kit	Qiagen
peqGold DNase I Digest Kit	peqlab Biotechnologie GmbH
peqGold Total RNA Kit	peqlab Biotechnologie GmbH
RNase Out™ Recombinant Ribonuclease Inhibitor	Invitrogen
TaqMan® 2x Universal PCR Master Mix No Amp Erase® UNG	Roche

4.1.6 Geräte

7900HT Fast Real-Time PCR System	Applied Biosystems
Accu-jet® pro	Brand
BD FACSCanto™ II Cytometer	BD Biosciences
Bio Photometer plus	Eppendorf

Centrifuge 5415 R	Eppendorf
Centrifuge 5417 R	Eppendorf
Einfrierautomat TRA-14 freezing chamber intelligent	Cryoson, Software Biofreeze BV50, Consarctic GmbH
Inkubator Heraeus BBD 6220	Thermo Scientific
Lichtmikroskop	Carl Zeiss Jena
Multimode microplate-reader FLUOstar Omega	BMG Labtech
Präzisions-Küvette	Hellma
Sterilwerkbank HERAsafe	Thermo Scientific
Thermomixer comfort	Eppendorf
Tischzentrifuge LMS	LMS Laboratory & Medica Supplies
Vortex-Genie® 2	Scientific Industries
Vortexgerät Reax 2000	Heidolph
Wasserbad	Julabo
Zählgerät Counter AC-15	Assistent
Zentrifuge Hettich/Rotanta/Tr	Hettich Zentrifugen
Zentrifuge Universal	Hettich

4.1.7 Arbeitsmaterialien

10, 100, 1000 µl Certified RNase/ DNase and Pyrogen Safe Pipetten	Nerbe Plus
BD Falcon™ 5 ml Polystyrene round-bottom tube	BD Biosciences
Cellstar® (Polystyrol) 1; 2; 5; 10 ml	Greiner Bio-one
Cellstar® 96 Well Cell Culture Plate, steril	Greiner Bio-one
Cellstar® cell culture flasks	Greiner Bio-one
Cellstar® tubes (15 ml, 50 ml)	Greiner Bio-one
CombiTips® plus 0,1; 0,5; 0,25; 5; 10 ml	Eppendorf Biopur
Deckgläser	Menzel-Gläser
Dispenser-Tips 12,5 ml	ISO Certified

Eppendorf Multipipette® plus	Eppendorf
Eppendorf Reference autoclavable (10, 100, 200, 1000 µl)	Eppendorf
Gewebekulturplatte 6; 12; 96 Well steril	Greiner bio-one
Pasteur-Pipetten unsteril	Greiner bio-one
Pasteur-Röhrchen 2 ml unsteril	Greiner bio-one
Pipette Tip Gilson-Style 200 µl	Greiner bio-one
Pipettenspitzen kristall; 200; 1000 µl (Plastibrand)	Brand
Reaktionsgefäß 0,5; 1,5 ml (je nach Bedarf steril bzw. unsteril)	Eppendorf
Serumpipette steril	Greiner bio-one
Zählkammer Neubauer Improved	Feinoptik, Bad Blankenburg

4.1.8 Software

BD FACSDiva™ Software

Omega- Software (Photometrische Messung der Caspase-3-Aktivität)

MARS Data Analysis Software (Auswertung Caspase)

Origin 8.0 Software (Grafische Auswertung)

Microsoft Excel 2007 (Statistische Auswertung)

SDS 2.2.2 (Messung und Auswertung der TaqMan®-PCR)

4.2. Methoden

4.2.1 Kultivierung der Zellen

Alle Zellkulturarbeiten erfolgten unter sterilen Bedingungen an der Werkbank Herasafe (Thermo Scientific). Verwendet wurden folgende Zelllinien: SK-ES1, SK-N-MC, CADO-ES1, RD-ES und WE-68. Es handelt sich dabei um Ewing-Sarkom-Zellen, die adhärent und einschichtig wachsen und für optimale Wachstumsverhältnisse kollagen-beschichtete Kulturflaschen benötigen. Die Beschichtung der Kulturflaschen mit Kollagen wird in 4.2.1.2 beschrieben.

Zur Kultivierung wurden, entsprechend den Herstellerangaben, jeweils unterschiedliche Komplettmedien benötigt. Die detaillierte quantitative Zusammensetzung der Medien ist aus dem Abschnitt 4.1.1 zu entnehmen.

4.2.1.1 In-Kulturnahme der Zellen

Jede Zelllinie wurde in Form mehrerer Aliquots in flüssigem Stickstoff gelagert. Bei Bedarf erfolgte die Entnahme eines Aliquots aus dem Stickstoff-Behälter. Unter ständigem Schwenken wurde das Kryoröhrchen schnell im Wasserbad bei 37°C aufgetaut. Danach konnten die Zellen unter sterilen Bedingungen in 15 ml des jeweiligen supplementierten Mediums aufgenommen und bei Raumtemperatur für drei Minuten bei 1200 rpm zentrifugiert werden. Der Überstand wurde entfernt, das Zellpellet wurde in 20 ml Kompletmedium aufgenommen und in eine neue Kulturflasche gefüllt.

Damit eine Verunreinigung mit Mycoplasmen verhindert wird, wurden das Kryotube und der Kulturflaschen-Hals mit sterilen Tüchern gereinigt.

Es folgte die Lagerung im Brutschrank und die Begutachtung der Kultur nach einem Tag unter dem Lichtmikroskop. Hierbei wurden sowohl Adhärenz und Dichte der eingesäten Zellen bewertet. Eventuell waren weitere Tage im Inkubator zur Kultivierung und optimalem Wachstum nötig.

4.2.1.2 Kollagenbeschichtung

Zur Beschichtung der Kulturflaschen wurde 10 mg steriles Lyophilisat aus Rattenschwanzkollagen in 500 ml steriler 0,1-prozentiger Essigsäure gelöst.

Entsprechend folgender Vorgabe wurde die Kollagenlösung in die Kulturflaschen bzw. auf die Well-Platten gegeben:

75 cm ² Kulturflasche	18 ml Kollagenlösung
12-Well-Platte	1 ml/Well
96-Well-Platte	100 µl/Well

Für 24 Stunden wurde die Kollagenlösung belassen und anschließend abgesaugt. Circa 30 Minuten waren nötig, damit die Kulturflaschen und Well-Platten unter sterilen Bedingungen trockneten. Anschließend folgte die sterile Lagerung bei Raumtemperatur.

4.2.1.3 Passagieren der Zellen

Die Kultivierung erfolgte jeweils in den kollagen-beschichteten Kulturflaschen mit einer Wachstumsfläche von 75 cm² und dem jeweils geeigneten supplementierten Medium. Bei einer Temperatur von 37°C, einem CO₂-Gehalt von 5 % und einer relativen Luftfeuchte von 95 % wurden die Kulturflaschen im Inkubator (Thermo Scientific Heraeus BBD 6220) gelagert.

Vor dem Passagieren wurden steriles Komplettmedium, Trypsin/EDTA (1*) und PBS im Wasserbad circa 10 min auf 37°C vorgewärmt.

Im Lichtmikroskop erfolgte außerdem die Begutachtung der Zellen in der Stammkulturflasche hinsichtlich Konfluenz, Adhärenz und Vitalität.

Anschließend wurde die Kulturflasche unter der Sterilwerkbank HERAsafe (ThermoScientific) zweimal mit jeweils 10 ml PBS gespült. Danach wurde die Kultur mit 2,5 ml Trypsin/EDTA für 10 bis 12 min bei 37°C inkubiert. Bei den Zelllinien CADO-ES1 und RD-ES waren Inkubationszeiten bis zu 15 min notwendig, da diese eine ausgesprochene Clusterbildung und Adhärenz aufwiesen. Nachdem sich alle Zellen vollständig vom Flaschenboden gelöst hatten, wurden sie, abhängig von der Dichte des Zellpellets, in 10 bis 15 ml Nährmedium aufgenommen und zentrifugiert.

Durch die Zellzählung in der Neubauer-Zählkammer mittels Zählgerät (Counter AC-15) wurde vor dem Aussäen in Kulturflaschen die Zellzahl und Vitalität bestimmt.

Anschließend wurden die Zellen in eine neue Kulturflasche überführt und bis zu einem Gesamtvolumen von 20 ml mit dem entsprechend benötigten Medium aufgefüllt und im Inkubator weiter kultiviert.

4.2.1.4 Einfrieren der Zellen

Um die Zellen dauerhaft aufzubewahren, lagern sie in flüssigem Stickstoff bei -180°C. Hierzu wurden die Zellen mithilfe von 2 ml Trypsin-EDTA-Lösung vom Boden der Zellkulturflasche abgelöst, im vorgewärmten Medium aufgenommen und für 5 min zentrifugiert. Nach dem Dekantieren des Zellüberstandes und anschließendem Auszählen der Zellzahl in der Neubauer-Zählkammer wurde das Zellpellet in einem Gemisch aus 20 % fetalem Kälberserum und 5 % DMSO resuspendiert und in einem Kryoröhrchen mit jeweils circa 3,5 Millionen Zellen pro Röhrchen aliquotiert. Mittels Einfriersystem (Einfrierautomat TRA-14 intelligent freezing chamber, Cryoson, Software Biofreeze BV50, Consarctic GmbH) wurden die Kryoröhrchen innerhalb von

50 min schrittweise auf eine Temperatur von -120°C herab gekühlt und nachfolgend in flüssigem Stickstoff eingefroren.

4.2.1.5 Bestimmung der Zellzahl und Vitalität

Zur Bestimmung der benötigten Zellzahl und der Unterscheidung vitaler und toter Zellen wurde der Trypanblau-Ausschlusstest verwendet.

Hierzu wurde eine Zellsuspension angefertigt, indem die zuvor trypsinisierten und zentrifugierten Zellen mit 10 bis 15 ml Medium aufgeschwemmt wurden. 20 µl dieser Zellsuspension wurden mit 20 µl Trypanblau in einem Mikroröhrchen gemischt und diese Lösung in eine Neubauer-Zählkammer (Improved, Feinoptik, Bad Blankenburg) gegeben.

Während tote Zellen Trypanblau aufnehmen und sich dunkelblau färben, erscheinen vitale Zellen lichtmikroskopisch hell. Somit entspricht die Anzahl der blau gefärbten Zellen der Anzahl der toten Zellen in 0,1 µl der Zellsuspension.

Die gesamte Zellzahl wurde bestimmt, indem zwei Großquadrate (GQ) zu je 16 Kleinquadraten (KQ) ausgezählt wurden. Ein KQ besitzt eine Kantenlänge von 0,25 mm und eine Tiefe von 0,1 mm. Das Volumen eines KQ fasst demnach 0,025 mm³ und das eines GQ 0,1 mm³.

Die Zellzahl pro ml erhält man durch die Berechnung folgender Formel:

$$\frac{\text{Zellzahl}}{\text{ml}} = \frac{\text{Zellzahl}}{\text{Zahl der Großquadrate}} \times 2 \times 10^4$$

Die Vitalität ergab sich aus dem prozentualen Anteil der vitalen Zellen an der Gesamtzellzahl.

Für die benötigte Zelldichte der Experimente wurde jeweils eine Verdünnung errechnet, wobei in die 12-Wellplatten 100.000 bis 200.000 Zellen pro Well eingesät wurden.

4.2.1.6 Test auf Mycoplasmen

Um eine Kontamination mit Mycoplasmen, intrazellulären zellwandlosen Prokaryoten, auszuschließen, wurde ein PCR-Mycoplasmen-Test-Kit von Applichem verwendet.

Dazu wurden Proben der Zellkultur zentrifugiert und der Zellüberstand in ein steriles Mikrotube überführt. Der Zellüberstand wurde erneut sedimentiert und dieser Überstand dekantiert. Anschließend folgte die Resuspendierung des Zellpellets mit

50 µl Pufferlösung und Erhitzen für drei Minuten auf 95°C. Die Probe wurde für die PCR-Amplifikation mit Wasser und dem Mycolasmen-Test-Mix versehen.

Für die Analyse wurden 20 µl des amplifizierten PCR-Produkts auf ein 2-prozentiges Agarose-Gel gegeben und mittels Gelelektrophorese verifiziert.

Die In-Kulturnahme der Zellen, das Beschichten der Well-Platten und Kulturflaschen sowie die regelmäßige Mycoplasmentestungen wurden freundlicherweise durch die medizinisch-technischen Angestellten Susan Wittig und Sabine Becker vorgenommen.

4.2.2 Zellbehandlung

Die Zellen wurden in 12-Wellplatten zu jeweils 150.000 bis 200.000 in 1 ml des jeweils benötigten Kulturmediums ausgesät und für 24 h im Brutschrank belassen, damit sich die Zellen erneut am Boden der Kulturflasche festsetzen konnten. Danach schloss sich eine lichtmikroskopische Beurteilung der Konfluenz, Adhärenz und Vitalität der ausgesäten Zellen an.

Anschließend folgte die Applikation von Tenovin-1 bzw. MS-275 und nach einer vierstündigen Inkubationszeit die Behandlung mit 2 µM bzw. 1 µM RETRA. Es wurde außerdem eine umgedrehte Kombination angewandt, um die Wirkungseffekte besser darstellen zu können. Dabei wurden zuerst Tenovin-1 bzw. die HDACi und nach vier Stunden eine aufsteigende RETRA-Konzentration appliziert.

Die geeigneten Konzentrationen der Kombinationen von Tenovin-1 bzw. den HDACis MS-275 und SAHA und RETRA mussten zu Beginn der Experimente mittels Durchflusszytometrie ermittelt werden. In der nachfolgenden Tabelle 4-1 sind die verwendeten Konzentrationen aufgeführt.

Chemotherapeutika	Stammlösung	Verdünnungs-lösung	Verwendete Konzentration-en
Tenovin-1	20 mM	DMSO	0,5; 1; 2; 3; 5; 10 µM
RETRA	20 mM	jeweiliges Medium	0,7; 1; 1,4; 2; 3 µM
MS-275	10 mM	jeweiliges Medium	0,5; 1; 2; 5 µM
SAHA	10 mM	jeweiliges Medium	0,5 µM

Tabelle 4-1: Verwendete Konzentrationen der Zellbehandlung

4.2.3 Durchflusszytometrie (FACS)

Die Durchflusszytometrie „FACS“ stellt ein Messverfahren zur Analyse von Eigenschaften einzelner Partikel und Zellen dar. Dabei steht der Ausdruck „FACS“ für „Fluorescence activated cell sorting“ eine geschützte Handelsmarke der Firma Becton Dickson. Die Analysen wurden mit dem Gerät FACSCanto™ II Cytometer entsprechend dem Protokoll des Herstellers durchgeführt.

Das Prinzip der Durchflusszytometrie beruht auf der Detektion optisch emittierter Signale. Durch einen Flüssigkeitsstrom fokussiert, werden die Zellen der zu analysierenden Zellsuspension einzeln nacheinander durch einen Laserstrahl geführt. Je nach Zellgröße und –eigenschaft wird nur ein Teil des Lichts gestreut und die dabei entstandenen Streu- und Fluoreszenzsignale erfasst. Durch unterschiedliche Lichtstreuung und Fluoreszenzemission können Größe, Granularität sowie Zellvitalität der Zelle bestimmt werden. Vorwärts eintreffendes Licht, im „Forward scatter channel“ (FSC) gemessen, gibt Auskunft über die Zellgröße. Durch seitlich abgelenktes Licht (90°) im „Side scatter channel“ (SSC) können Rückschlüsse über Zellgranularität bzw. den Inhalt der Zelle gezogen werden. Die Kombination von FSC und SSC ermöglicht die Differenzierung von Zelltypen in heterogenen Proben und Zellpopulationen. Durch die Applikation von Fluoreszenzfarbstoffen für verschiedene Wellenlängen können quantitative und qualitative Daten über Zelleigenschaften wie etwa Oberflächenmoleküle oder intrazelluläre Moleküle ermittelt werden. Fluoreszenzfarbstoffe besitzen die Eigenschaft, dass ihre Elektronen durch Licht verschiedener Wellenlänge auf ein energiehöheres Niveau gehoben werden. Bei der Rückkehr auf das Ausgangsniveau verlieren die zuvor angeregten Elektronen ihre Energie in Form von Licht wieder. Das nun emittierte Licht ist durch Energieverlust in Form von Wärme langwelliger und somit energieärmer als das vorher absorbierte Licht.

Die Spezifität der Signaldetektion der Fluoreszenzfarbstoffe wird durch optische Filter kontrolliert, die lediglich bestimmte Wellenlängen zum Detektor passieren lassen. Die detektierten Lichtsignale werden schließlich in elektrische Signale umgewandelt und können dann mithilfe einer speziellen Software (BD FACSDiva™) am Computer ausgewertet und grafisch dargestellt werden.

Um Artefakte von der Berechnung auszuschließen, wurden in der grafischen Auswertung definierte Bereiche (Gates) für die Analyse ausgewählt.

4.2.3.1 Analyse des Zelltodes mittels Propidiumjodid

Propidiumjodid (PI) ist ein fluoreszierender Farbstoff, der in die DNA, also doppelsträngige Nukleinsäuren, interkaliert und nur von Zellen mit gestörter Membranintegrität oder perforierter Zellmembran aufgenommen wird. Somit kann eine Aussage zur Zellvitalität getroffen werden, da PI lediglich von toten Zellen aufgenommen wird (Nicoletti et al. 1991). Durch die Aufnahme in Nukleinsäuren erhöht sich die Fluoreszenzintensität des Moleküls um das 20- bis 30-fache, was die Verwendung in der Durchflusszytometrie ermöglicht. Interkaliertes PI hat ein Absorptionsmaximum von 535 nm und ein Emissionsmaximum von 617 nm im roten und orangen Bereich. Ab einer Konzentration von 1 µg/ml sind alle DNA-Bindungsstellen mit PI abgesättigt.

Für die Analyse des Zelltodes mithilfe der Propidiumjodidaufnahme wurden die Zellen zu 150.000 pro Well einer 12-Wellplatte ausgesät. 48 h nach Behandlung wurden die Zellen zusammen mit dem Überstand in FACS-Röhrchen geerntet und die restlichen Zellen der Wellplatte mit 250 µl Trypsin/EDTA pro Well für 12 bis 15 min inkubiert. Anschließend folgte ein zweimaliges Waschen der Wells mit jeweils 1ml PBS pro Well und der Zentrifugation bei 1800 rpm für 5 min. Der Überstand wurde verworfen, die Zellen in 500 µl je FACS-Röhrchen resuspendiert und bis zur Messung auf Eis gelagert. Eine Ausnahme stellte hierbei jedoch die Zelllinie CADO-ES1 dar. Diese Zellen wurden mit 500 µl farblosem RPMI-Medium und 2% FKS versetzt und nicht auf Eis gelagert, da die CADO-ES1 in besonderer Weise auf Temperaturunterschiede reagiert.

Zur geernteten Zellsuspension wurde jeweils 1 µl Propidiumjodid kurz vor der Messung am Durchflusszytometer gegeben und die Proben vor Lichteinwirkung geschützt. Am Durchflusszytometer wurden 10.000 Zellen pro Probe gemessen. Um eine Eigenfluoreszenz der Zellen zu ermitteln, wurden Zellen ohne PI-Applikation als Negativkontrolle mitgeführt.

4.2.3.2 Analyse des mitochondrialen Membranpotentials

Die Bestimmung des mitochondrialen Membranpotentials dient ebenfalls zur Analyse der Zellvitalität. Es stellt eine essentielle Voraussetzung für den Ablauf der Atmungskette und sogleich einen frühen Indikator der Apoptose und des Zelltodes dar.

DIOC₆(3) (3,3'-Dihexyloxacarbocyaniniodid), ein positiv geladener Fluoreszenzfarb-

stoff (Absorptions-/Emissionsmaximum bei 484/501 nm), kann durch Plasmamembranen von Zellen diffundieren und bindet entsprechend seiner Ladung an die negativ geladene innere Mitochondrienmembran. Ist das Membranpotential gestört oder erloschen wie bei apoptotischen Zellen, kann dieser grün-fluoreszierende lipophile Farbstoff nicht mehr angelagert und dementsprechend kein Fluoreszenzsignal detektiert werden (Vermees et al. 2000). Folglich stellen sich durch die Färbung mit DIOC₆ (3) lediglich vitale Zellen dar. Die gemessene Fluoreszenz kann dann prozentual dargestellt werden (Rottenberg und Wu 1998).

Für die Analysen wurden die Zellen 48 h nach der Behandlung mit 50 nm DIOC₆ (3) (1 µl pro 1 ml Well) für 30 min bis 60 min unter Lichtschutz inkubiert und anschließend mit dem Überstand geerntet. Hierbei wurde das Well ebenfalls mit 2,5ml Trypsin/EDTA für 12 bis 15 min inkubiert, um ein vollständiges Ablösen der Zellen vom Well-Boden zu erreichen. Nach zweimaligem Spülen mit jeweils 1 ml PBS pro Well folgte die Zentrifugation bei 1800 rpm für 5 min. Anschließend wurde das Zellpellet in 500 µl PBS gelöst und die Zellen auf Eis gelagert.

Als Negativkontrolle wurden unbehandelte Zellen mitgeführt, um eine mögliche Eigenfluoreszenz der Zellen zu eruieren und von der Berechnung auszuschließen.

Es wurden 10.000 Zellen pro Probe ausgewertet.

Die unter 4.2.3.1 und 4.2.3.2 beschriebenen Analysen mit den Fluoreszenzfarbstoffen Propidiumjodid und DIOC₆ (3) erfolgten jeweils in einem Arbeitsschritt und wurden entsprechend simultan am Durchflusszytometer ausgewertet.

4.2.3.3 Zellzyklusbestimmung

Mithilfe der Zellzyklusbestimmung kann neben einer prozentualen Verteilung der Zellen in den einzelnen Zellzyklusstadien eine Aussage über den stattgefundenen Zelltod gewonnen werden. Der Zellzyklus lässt sich in zwei Phasen unterteilen: die Interphase und die Teilungsphase. Hierbei wird die Interphase nochmals unterteilt: in G₁-, S- und G₂-Phase (Schafer, 1998). In den G-Phasen („gap“) findet keine Synthese der DNA, sondern lediglich ein Wachstum der Zelle statt. In der S- („synthesis“) Phase wird die DNA verdoppelt. Der Interphase schließt sich die Teilungsphase an. Diese besteht aus Mitose, der Teilung des Zellkerns und der Zytokinese, der Teilung des Zytoplasmas.

Um die Zellen in ihrem jeweiligen Zellzyklusstadium zu belassen und die Zellmembran für die PI-Aufnahme zu permeabilisieren, wurden die Zellen mit eiskaltem 70-prozentigem Ethanol fixiert. Durch den Einsatz von RNase wurde die vorhandene RNA abgebaut.

Da die gemessene Fluoreszenz des Propidiumjodids proportional zur DNA-Menge ist, kann ein Rückschluss auf die verschiedenen Stadien des Zellzyklus gezogen werden. Apoptotische Zellen weisen hierbei eine Fragmentation der DNA auf (Umansky 1982, Walker et al. 1994), besitzen somit die geringste DNA-Menge und werden als subG₁-Fraktion gemessen (Telford et al. 1992). Hingegen weist die Zelle am Ende der S-Phase den doppelten DNA-Gehalt und somit eine stärkere Fluoreszenz als G₁-Zellen auf.

Die Zellzyklusanalyse erfolgte ebenfalls mit dem Durchflusszytometer BD FACSCanto™ II.

Bei dieser Methode wurden die Zellen 48 h nach der Behandlung in FACS-Röhrchen nach dem selben Arbeitsprinzip wie bei den vorherbeschriebenen Methoden geerntet und bei 1500 rpm 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde dekantiert und das Zellpellet mit der zurücklaufenden Flüssigkeit (PBS) vereinzelt. Anschließend erfolgte die tröpfchenweise Zugabe von 2 ml 70-prozentigem Ethanol unter ständigem Vortexen und die Lagerung bei -20°C im Gefrierschrank über Nacht. Danach wurden die eiskalten FACS-Röhrchen erneut bei 1800 rpm 5 min zentrifugiert, der Überstand abgenommen und die Zellen in 500 µl Lösung einer Lösung aus PBS mit 1% Glucose, 50 µg/ml Propidiumjodid und 50 µg/ml RNase erneut resuspendiert. Während der tropfenweisen Zugabe der Färbelösung bei ständigem Vortexen wurden die Proben stets auf Eis gelagert. Nachfolgend schloss sich eine 45-minütige Inkubation unter Lichtschutz bei 4°C an.

Bei der durchflusszytometrischen Messung wurden jeweils 20.000 Zellen pro Probe gemessen.

4.2.4 Bestimmung der Caspase-3-Aktivität

Die Caspase-3 stellt als Effektorcaspase einen wichtigen Baustein im Signalweg der Apoptose dar. Dabei spaltet diese Cystein-Protease Enzyme, wie die Poly (ADP ribose)-Polymerase (PARP). PARP wird C-terminal an der Stelle Asp-216 von der Caspase-3 gespalten. Die oberhalb dieser Angriffsstelle gelegene Sequenz DEVD (Asp-Glu-Val-Asp) ist eine hochspezifische Erkennungssequenz für die Caspase-3

(Nicholson et al. 1995). Als synthetisches Substrat wird Ac-DEVD-AMC, ein Amino-4-methylcoumarin, verwendet. DEVD ist hierbei an ein fluoreszierendes Molekül, AMC, gebunden, das nach Abspaltung durch die Anregung bei 380 nm Licht bei 430 bis 460 nm Licht emittiert. Mithilfe eines Fluoreszenzspektrometers kann die Lichtemission gemessen werden und dient damit in apoptotischen Zellen der Identifizierung und Quantifizierung der Caspase-3-Aktivität.

Für die Bestimmung der Caspase-3-Aktivität wurden 200.000 Zellen pro Well in einer 12-Wellplatte ausgesät. 24 h nach der Behandlung wurden die Zellen mit 250 µl Trypsin/EDTA für 12 bis 15 min inkubiert und danach zweimal mit jeweils 1 ml PBS pro Well gewaschen. Anschließend wurde das Zellröhrchen mit 12 ml PBS aufgefüllt und bei 1800 rpm für 5 min zentrifugiert. Der Überstand wurde verworfen und das Zellpellet auf Eis gehalten. Anschließend wurde das Zellsediment mit jeweils 100 µl Caspase-3-Lysepuffer (ph 7,5) ohne Luftblasen aufgenommen, vereinzelt und in vorgekühlten Eppendorfgefäßen für 15 min bei 4°C inkubiert. Der Lysepuffer musste zuvor angesetzt werden.

Für 50 ml Lysepuffer:

NaH ₂ PO ₄ / Na ₂ HPO ₄	25 ml (20 mM)
Tris-HCl ph 7,5	5 ml (100 mM)
NaCl	6,5 ml (1 M)
Na ₄ P ₂ O ₇	5 ml (100 mM)
Triton X-100	0,5 ml (100%)

Diese Lösung musste mit Aqua dest. auf 50 ml aufgefüllt und mit circa 100 µl 9% HCl auf den ph7,5 eingestellt werden.

Der Aktivitätspuffer wurde entsprechend der Probenmenge nach folgender Zusammensetzung angefertigt:

Der Aktivitätspuffer für 1 ml (7 Proben à 110 µl):

Aqua dest.	0,828 ml
HEPES 1 M	0,020 ml
Glycerin	0,100 ml

Zugabe kurz vor Applikation des Aktivitätspuffers:

DTT 0,002 ml

Caspase-3-Substrat 0,050 ml

Auf die lysierten Proben wurden 110 µl des zuvor angesetzten Aktivitätspuffers gegeben. Die Proben wurden sorgfältig gemischt und ohne Luftblasen wurde der gesamte Probeninhalt von 210 µl auf eine 96-Wellplatte überführt und für zwei Stunden lichtgeschützt im Brutschrank bei 37°C inkubiert.

Pro Messreihe wurde ein Leerwert mitgeführt, der lediglich den Lyse- und Aktivitätspuffer enthält. Außerdem wurde pro Messreihe 210 µl A.dest. als Nullwert verwendet.

Die Messung erfolgte am Fluoreszenzphotometer (FLUOstar Omega) bei einer Excitation von 355 nm und einer Emission von 460 nm Wellenlänge. Zur Bestimmung der Caspase-3-Aktivität wurde der Mittelwert der Leerwerte gebildet und dieser von den gemessenen Fluoreszenzen der Proben subtrahiert. Für die graphische Auswertung wurde die unbehandelte Probe als 1 gesetzt und die relative Caspase-3-Aktivität der Proben in Bezug darauf berechnet.

4.2.5 Genexpressionsanalyse von p21

Zur Untersuchung der Genexpression in Ewing-Sarkom-Zellen wurde als Vervielfältigungsmethode der Nukleinsäuren die „Real time“ RT-PCR (reverse transcriptase polymerase chain reaction) verwendet. Hierbei wurde die p21-Expression untersucht, um eine Aussage über die Wirkungsweise des Sirtuininhibitors Tenovin-1 bzw. der HDACi in Kombination mit dem p73-Aktivator RETRA zu treffen. p21 ist ein CDK-Inhibitor (cyclin dependent kinase inhibitor 1), der die Progression des Zellzyklus hemmt. Außerdem stellt p21 ein Zielgen des Tumorsuppressorproteins p53 dar und führt damit in Zellen mit geschädigter DNA zum Wachstumsarrest (Gartel and Radhakrishnan 2005). Des Weiteren bewirkt p73 eine transkriptionelle Aktivierung von p53-relevanten Zielgenen, dabei auch p21 (Zhu et al. 1998, Yang et al. 2002).

Um beim Arbeiten eine Kontamination mit RNase zu verhindern, wurden RNase-freies Wasser sowie wattierte Pipettenspitzen verwendet. Getrennte räumliche Arbeitsplätze wurden genutzt, um die RNA-Isolation und die „Real time“ RT-PCR durchzuführen.

Für die Genexpressionsanalyse wurden jeweils zweimal 200.000 Zellen pro Well einer 12-Wellplatte ausgesät, sodass pro Probe 400.000 Zellen vorhanden waren. Die Behandlung der Zellen erfolgte nach dem selben Ablauf wie bereits in Abschnitt 4.2.2 beschrieben. Die behandelten Zellen wurden für 24 h im Brutschrank bei 37°C inkubiert. Anschließend folgte das Entnehmen des Zellüberstandes in ein RNase-freies Röhrchen (15 ml) und einmaliges Spülen des Wells mit 1 ml vorgewärmter PBS-Lösung. Dann wurde jedes Well mit 250 µl vorgewärmten Trypsin/EDTA für 12 bis 15 min im Brutschrank inkubiert, damit sich die restlichen Zellen vom Boden des Wells ablösen konnten. Nachfolgend wurde zweimal mit 1 ml PBS-Lösung gespült und das Zellröhrchen auf 10 ml mit PBS aufgefüllt. Dieses Zellröhrchen wurde bei 1800 rpm für 3 min zentrifugiert und der Überstand dekandiert.

4.2.5.1 RNA-Isolation mittels des PeqGold Total RNA Kit

Die RNA-Isolation folgte nach dem Arbeitsprotokoll des PeqGold Total RNA Kit (Peqlab Biotechnologie GmbH). Hierbei wurde die RNA selektiv an eine Silikamembran einer PerfectBind-Säule gebunden. Die Zellen im Zellröhrchen wurden zunächst mit jeweils 400 µl RNA-Lysis-Buffer-T lysiert, wodurch RNase und andere Enzyme abgebaut wurden. Das Lysat konnte anschließend auf eine grüne DNA-Removing-Säule pipettiert und bei 13000 rpm für 2 min zentrifugiert werden. Nachfolgend wurde die grüne DNA-Removing-Säule verworfen und lediglich das Unterstandröhrchen beibehalten. Zum Filtrat wurden nun 400 µl 70-prozentigen Ethanol gegeben und erneut sorgfältig gemischt, wodurch die Nukleinsäuren gefällt wurden. Anschließend wurde dieses Gemisch auf eine orange PerfectBind-RNA-Säule pipettiert und bei 13000 rpm für 1 min zentrifugiert. Erneut wurde der Unterstand verworfen. 500 µl RNA-Waschpuffer I wurde zu der orangen PerfectBind-RNA-Säule hinzugefügt und für 5 min bei Raumtemperatur belassen, um Kontaminationen zu entfernen. Erneut folgten eine kurze Zentrifugation bei 13000 rpm und das Verwerfen des Unterstandröhrchens.

Um möglicherweise verbliebene DNA zu entfernen, wurde zusätzlich ein DNase-Verdau durchgeführt. Dafür wurde das peqGold DNase I Digest Kit (peqlab Biotechnologie GmbH) genutzt. Der DNase-Verdau bestand aus 1,5 µl DNase und 73,5 µl DNase-Digestionspuffer je Probe. Jeweils 75 µl dieser Mischung wurden auf die orange PerfectBind-RNA-Säule pipettiert und für 15 min bei Raumtemperatur belassen. Anschließend folgten mehrere Waschschriffe. Beim ersten Waschen

wurden 350 µl RNA-Waschpuffer I auf die orange PerfectBind-RNA-Säule gegeben, kurz zentrifugiert und der Unterstand verworfen. Nachfolgend wurde das Filtrat zweimal mit 500 µl RNA-Waschpuffer II gewaschen, kurz zentrifugiert und der Unterstand entfernt. Nach dem letzten Waschschrift wurde die PerfectBind-Säule bei zweiminütigem Zentrifugieren getrocknet. Anschließend wurde die orange PerfectBind-RNA-Säule auf ein Eppendorfgefäß (1,5 ml) gesetzt und die RNA eluiert. Bei einem großen Sediment wurden jeweils 70 µl und bei einem kleinen Sediment 35µl RNase freien Wassers verwendet. Das entstandene Eluat wurde bei 13000 rpm für 1 min zentrifugiert, die orange PerfectBind-RNA-Säule verworfen und die im Unterstand aufgefangene RNA auf Eis aufbewahrt. Nun konnten die gewonnenen Proben eingefroren bzw. auf Eis gestellt werden und anschließend für die photometrische Messung verwendet werden.

4.2.5.2 Photometrische Konzentrationsbestimmung der RNA

Damit die Konzentration und Reinheit der RNA ermittelt werden konnte, musste die Absorption der vorher verdünnten Lösung bei den Wellenlängen 260 nm und 280 nm am Bio Photometer (Eppendorf) gemessen werden. Zur Messung wurde eine UV-Licht-durchlässige Glasküvette aus Quarzglas (Hellma) genutzt. Eine Konzentration von 40 µg RNA pro ml entspricht dabei einer gemessenen Absorptionseinheit bei 260nm von 1 (optische Dichte $OD_{260} = 1$). Die Konzentration kann nach folgender Formel berechnet werden:

$$\text{RNA-Konzentration in } \mu\text{g/ml} = \text{Absorption}_{260} \times 40 \times \text{Verdünnungsfaktor}$$

Anhand des Quotienten aus der Absorptionsmessung bei 260 nm (RNA) und 280 nm (Protein) konnte eine Aussage über die Reinheit der RNA-Isolierung getroffen werden. Der Quotient aus dem Verhältnis von $A_{260/280}$ sollte bei reinen Nukleinsäuren 2,0 betragen. Unter Verwendung des peqGOLD Total RNA Kit kann ein Quotient von 1,8 bis 2,0 erreicht werden. Niedrigere Werte können durch Verunreinigung von Proteinen oder EDTA entstehen.

RNase-freies Wasser diente als Leerwert und Verdünnungsmittel der gewonnenen RNA-Proben. 80 µl RNase-freies Wasser wurde dazu vor Beginn der Probenmessung in die Glasküvette pipettiert und photometrisch als Leerwert gemessen. Die RNA-Proben wurden sorgfältig gemischt und anschließend kurz

zentrifugiert. Es wurde auf Eis weitergearbeitet und jeweils 4 µl der RNA-Probe mit 76 µl RNase-freiem Wasser verdünnt. Dieses Gemisch wurde sorgfältig gemischt und kurz zentrifugiert. Anschließend konnten die verdünnten Proben am Photometer gemessen werden.

Jeweils 0,5 µg RNA jeder Probe wurden im nächsten Arbeitsschritt mittels Omniscript® Reverse Transcription Kit in cDNA umgeschrieben. Dafür musste die Probenvorverdünnung berechnet werden, indem 0,5 µg durch die am Photometer erhaltene Konzentration (µg/µl) dividiert wurde. Der erhaltene Wert stellte die Menge der RNA-Probe dar, die vor dem Umschreiben auf 13 µl mit RNase freiem Wasser aufgefüllt wurde.

4.2.5.3 Umschreiben der RNA in c-DNA mittels Omniscript® RT Kit

Das Umschreiben der isolierten RNA in cDNA wurde mittels der Arbeitsanweisung des Omniscript® Reverse Transcription Kits von Qiagen durchgeführt.

Dazu wurde für jede Probe folgender Mix verwendet:

10×Buffer-RT	2 µl
dNTP-Mix	2 µl
Random-Hexamer	2 µl
RNase-Out	0,25 µl
Omniscript Reverse Transcriptase (RT)	1 µl

Alle Reagenzien außer der RNase und der Omniscript-RT wurden vor der Anwendung mittels Vortex®-Gerät gemischt und anschließend kurz zentrifugiert. Die zuvor verdünnten RNA-Proben wurden auf Eis gestellt und zu jeder Probe wurden 7µl des angesetzten Omniscript®-Mixes gegeben und kurz zentrifugiert. Nachfolgend wurden die Proben für eine Stunde bei 37°C im Wärmeblock inkubiert. Danach konnten die umgeschriebenen Proben bei -20°C eingefroren oder sofort für die „Real time“ RT-PCR verwendet werden.

4.2.5.4 „Real Time“ RT-PCR (TaqMan®)

Die Polymerase-Kettenreaktion (PCR) ist eine sehr sensitive Methode in der DNA-Analytik, die vielfältige Anwendung in Diagnostik und Wissenschaft findet. Sie dient der Vervielfältigung eines beliebigen Abschnittes der DNA. Die „Real time“ PCR ist

eine effiziente Weiterentwicklung der Standard-PCR und dient ebenfalls der mengenmäßigen Erfassung der PCR-Produkte. Dabei wird die Synthese des Produktes im Laufe der Reaktionszyklen in Echtzeit erfasst. Bei den hier durchgeführten Experimenten zur Analyse der Genexpression von p21 wurde eine Kombination von „Real time“ PCR und Reverse Transkriptase-PCR (RT-PCR) genutzt. Diese kombinierte Methode stellt derzeit die modernste Methode zur Quantifizierung von Nukleinsäuren dar. Dabei werden zwei Funktionsprinzipien vereint. Einerseits wird die in der Probe enthaltenen mRNA durch Reverse Transkription in einzelsträngige cDNA umgeschrieben, wobei die cDNA als Template für die PCR dient. Andererseits wird im Reaktionszyklus das Verfahren der „Real time“ PCR angewendet. Der Ablauf dieser kombinierten Methode wurde nach einem Zweischnittprotokoll durchgeführt. Dabei erfolgte zuerst das Umschreiben der mRNA mittels Reverser Transkriptase in cDNA und im nachfolgenden Schritt die Amplifikation mittels hitzestabiler Taq-DNA-Polymerase von dem Mikroorganismus *Thermus aquaticus*.

Die Sequenz des zu vervielfältigenden DNA-Abschnittes muss bekannt sein, damit zwei kurze Oligonukleotide, die Primer genannt werden, jeweils zu Beginn der PCR an einem der Stränge der Doppelhelix binden können. Es werden spezifische Primer genutzt, die eine Voraussetzung für die DNA-Synthese darstellen und außerdem den zu amplifizierenden Abschnitt begrenzen.

Der Ablauf der Realtime RT-PCR setzt sich aus zwei Reaktionszyklen zusammen, bei denen jeweils die Temperatur wechselt. In der ersten Phase wird durch eine Denaturierungstemperatur von circa 95°C die Basenpaarung des DNA-Doppelstranges aufgelöst, sodass zwei Einzelstränge entstehen, die als Matrize für die Synthese dienen. In der zweiten Phase wird die Temperatur auf 60°C gesenkt, damit die Primer an die Einzelstränge anhybridisieren (Annealing). Anschließend wird die Temperatur erneut auf 95°C erhöht, wobei die Synthese des DNA-Abschnittes durch die Taq-Polymerase erfolgt. Zunächst werden an jedem Strang „lange“ Produkte synthetisiert, die ein gleiches 5'- aber zufälliges 3'-Ende besitzen. Der Reaktionszyklus aus Denaturierung, Hybridisieren und Synthese wiederholt sich erneut. Da die „langen“ PCR-Produkte denaturiert werden entstehen vier Stränge, die in der Synthesephase vervielfältigt werden. Folglich entstehen vier doppelsträngige Produkte, wobei zwei mit den langen Molekülen identisch sind, während die anderen beiden aus neuer DNA bestehen. An den letzteren werden im

dritten Zyklus „kurze“ PCR-Produkte gefertigt, deren Anzahl in den nachfolgenden Zyklen exponentiell steigt. Insgesamt werden die zwei Zyklusphasen circa vierzigmal durchlaufen.

Das Verfahren der „Real time“ PCR beinhaltet eine fluorogene Sonde zur Detektion der PCR-Produkte während der Amplifizierung. Diese Sonde trägt zwei Markierungen. An das 5'-Ende der Sonde wurde dabei ein fluoreszierender Reporter-Farbstoff kovalent hinzugefügt. Das andere, 3'-Ende besitzt die zweite Markierung, die Quencher oder „Löschgruppe“ genannt wird. Dieser nicht fluoreszierende Quencher unterdrückt das Fluoreszenzsignal, weil die Sonde so gestaltet ist, dass die Energieabgabe des Reporters durch die räumliche Beziehung des Quenchers gehemmt wird. Dieses Detektionsprinzip wird als FRET (Fluorescence Resonance Energy Transfer) bezeichnet. Durch die Hybridisierung mit dem PCR-Produkt wird die Farbstoffmarkierung durch die 5'-Nukleaseaktivität der Taq-Polymerase abgespalten und der Quencher entfernt sich vom Farbstoff, wodurch ein Fluoreszenzsignal detektiert werden kann. Bei den hier verwendeten TaqMan®-Sonden wurde zusätzlich eine Minor-Groove-Binder (MGB)-Gruppe an das 3'-Ende der Sonde gehangen. Diese erhöht die Schmelztemperatur der Sonde, was unter anderem zu einer genaueren Genotypisierung beiträgt. Bei der TaqMan®-Sonde wird ein Quencher mit MGB-Gruppe und als Farbstoffmarkierung FAM™ (6-Carboxyfluorescein) bzw. VIC® genutzt.

Für die Messung mittels „Real time“ RT-PCR wurden für jede Probe und Negativ-Kontrolle folgende Mixe vorbereitet:

Für das Zielgen (1 Mix):

Mastermix	12,5 µl
Primer-Sonden-Mix (Zielgen)	1,25 µl
Aqua dest.	11,25 µl

Für das Housekeeping-Gen (1 Mix):

Mastermix	12,5 µl
Primer-Sonden-Mix (housekeeping Gen)	1,25 µl
Aqua dest.	11,25 µl

Dabei wurden je Probe immer eine Doppelbestimmung und zwei Negativkontrollen, die keine cDNA enthielten, mitgeführt. Vor dem Zufügen der Primer-Sonden-Mixe wurden diese sorgfältig gemischt und kurz zentrifugiert. Als Zielgen wurde p21 verwendet, das zu einem Zellzyklusarrest führt und unter anderem von p53 reguliert wird. β -2-Mikroglobulin (β 2M) diente als Housekeeping-Gen. Auch die fertigen Mixe wurden sorgfältig gemischt und kurz zentrifugiert. 50 μ l des Mixes wurden jeweils in ein Eppendorfgefäß vorgelegt und 2 μ l der cDNA-Probe hinzugegeben. Die Negativkontrollen enthielten lediglich den Zielgen- bzw. Housekeeping-Gen-Mix ohne cDNA. 25 μ l der Mixe wurden jeweils in ein Well einer 96-Wellplatte pipettiert. Ebenso wurden jeweils 25 μ l des Mixes mit cDNA in ein Well gegeben. Anschließend wurde die 96-Wellplatte mit einer Folie verschlossen, zentrifugiert und für 1,5 h im TaqMan®-Gerät amplifiziert.

Im Amplifikationsdiagramm zeigte sich der Reaktionsverlauf, da die nach jedem Zyklus ermittelten Reportersignale (ΔR_n -Werte) gegen die Anzahl der Zyklen aufgetragen wurden. Die Hintergrundaktivität der Sonde stellt sich dabei als „Baseline“ dar. Mit zunehmender Anzahl der durchlaufenen PCR-Zyklen nimmt auch die gemessene Fluoreszenz der PCR-Produkte zu. Überschreitet die Fluoreszenzintensität die „Baseline“, kann ein linearer Anstieg der Fluoreszenz der Proben detektiert werden. Diese arbiträre Schwelle wird als „Threshold“ und die bis dahin erfolgte Zyklen-Anzahl als „Threshold Cycle“ (C_T -Wert) bezeichnet. Lediglich im linearen Bereich oberhalb der Schwelle kann eine Auswertung des Graphen erfolgen, da hierbei eine Proportionalität zwischen der Zunahme des Signals und der Anzahl der hydrolysierten Sonden vorliegt.

Der C_T -Wert ist exponentiell, das heißt eine Zunahme um 1 bedeutet eine zweifache Steigerung der Expression, weshalb eine grafische Darstellung der C_T -Werte keine Anwendung findet. Vielmehr wird die $\Delta\Delta C_T$ -Methode als relative bzw. vergleichende Quantifizierung zur Auswertung verwendet. Dabei wird die relative Änderung der mRNA-Expression mit einer weiteren RNA-Referenzprobe verglichen. Häufig konstant exprimierte Gene werden als Referenzgene ausgewählt, wobei hier β 2M als endogene Kontrolle in jeder Probe mitamplifiziert wurde, um eine vergleichende Quantifizierung zu ermöglichen. Um die Änderung der Expression zu bestimmen, wurden die Unterschiede (Δ) zwischen den Schwellenwerten (Threshold cycle C_T) ermittelt.

Folgende Berechnung der $\Delta\Delta\text{CT}$ -Werte wurde angewendet:

$$\begin{array}{rcl} \text{Zielsequenz-CT} & - & \beta 2\text{M-CT} & = & \text{Zielsequenz-}\Delta\text{CT} \\ \text{Kontroll-CT} & - & \beta 2\text{M-CT} & = & \text{Kontroll-}\Delta\text{CT} \\ \text{Zielsequenz-}\Delta\text{CT} & - & \text{Kontroll-}\Delta\text{CT} & = & \Delta\Delta\text{CT} \end{array}$$

Dabei werden die $\Delta\Delta\text{CT}$ -Werte als negativer Exponent der Basis 2 gesetzt. Somit ist die Kontrolle 1 bzw. 100 %. Dies wird in folgender Formel ausgedrückt:

$$\text{Menge des Zielgens} = 2^{-\Delta\Delta\text{CT}}$$

5. Ergebnisse

Für die Analyse der zytotoxischen Wirkung von RETRA in Kombination mit den HDACi wurden verschiedene Methoden zur Bestimmung des Zelltodes verwendet. Die zytometrische Messung der PI-Aufnahme ermöglichte hierbei eine Unterscheidung zwischen toten Zellen, die PI in den Zellkern aufnehmen, und lebenden Zellen, die nicht angefärbt werden (Kapitel 4.2.3.1). Eine weitere Methode zur Quantifizierung toter Zellen stellte die Bestimmung der Integrität des mitochondrialen Membranpotenzials mittels des Fluoreszenzfarbstoffs DIOC₆(3) dar. Ein reduziertes mitochondriales Membranpotenzial bei toten Zellen führt dazu, dass DIOC₆(3) nicht mehr angelagert und demnach eine geringere Fluoreszenz am Durchflusszytometer detektiert wird (Kapitel 4.2.3.2). Außerdem diente die Zellzyklusanalyse mittels PI-Einfärbung zur Bestimmung der sogenannten subG₁-Fraktion, die als Korrelat für apoptotische Zellen gilt (Kapitel 4.2.3.3). Die Apoptoseabhängigkeit wurde des Weiteren durch den Caspase-3-Aktivitätstest überprüft. Die Caspase-3 stellt ein wichtiges Glied in der Signalkette der Apoptose dar. Durch die Spaltung eines künstlichen Substrates und die Freisetzung eines Fluoreszenzfarbstoffes konnte die enzymatische Aktivität am Fluoreszenzphotometer gemessen werden (Kapitel 4.2.4).

Die Experimente wurden an Zelllinien mit unterschiedlichem p53-Status durchgeführt und damit die Abhängigkeit der Substanzen von diesem Tumorsuppressor eruiert. Dazu standen zwei mt-p53-Zelllinien (RD-ES und SK-ES-1), zwei Wildtyp-p53-Zelllinien (CADO-ES-1 und WE-68) sowie eine Null-p53-Zelllinie (SK-N-MC) zur Verfügung.

Die geeigneten Konzentrationen der Substanzen wurden entsprechend einer optimalen Dosis-Wirkungsbeziehung in Vorversuchen ermittelt.

Die Variierung der Behandlungsschemata diente dem besseren Untersuchen und Darstellen der Wirkungseffekte. Bei der ersten Variante wurde die Vorbehandlung mit einer aufsteigenden Konzentration von Tenovin-1 (1-10 µM) bzw. MS-275 (0,5-5 µM) mit einer nachfolgenden Behandlung nach vier Stunden mit 2 µM RETRA durchgeführt. Bei der zweiten Kombination wurden die Zellen mit 0,5 µM SAHA bzw. 10 µM Tenovin-1 vorbehandelt und nach weiteren vier Stunden eine aufsteigende RETRA-Reihe (0,7-3 µM) appliziert. Jeweils abhängig von der nachfolgenden experimentellen Methode wurden die Zellen nach der Behandlung mit RETRA für

weitere 24 h beim Caspase-3-Aktivitätstest bzw. 48 h für die Zellzyklusanalyse und PI/DIOC₆(3)-Messung im Brutschrank inkubiert.

Zur Aufklärung des Wirkmechanismus der verwendeten Substanzen und zur Bestimmung der Expression beteiligter Gene wurde an jeder Zelllinie eine Genexpressionsanalyse von p21 mittels „Real time“ RT-PCR (TaqMan®) durchgeführt. p21 bewirkt als Inhibitor Cyclin-abhängiger Kinasen den Zellzyklusarrest in geschädigten Zellen und ist an der Regulation der Apoptose beteiligt. Es kann sowohl durch p53 als auch durch p73 induziert werden. Durch die Verwendung der Zelllinien mit unterschiedlichem p53-Status konnte eine Aussage zur jeweiligen Wirkungsweise der Substanzen und deren Abhängigkeit von der Funktionsfähigkeit der Tumorsuppressorproteine p53 und p73 getroffen werden.

5.1 Wirkung von Tenovin-1 im Vergleich mit den HDACi SAHA und MS-275 in SK-ES-1-Zellen

Um den zytotoxischen Einfluss von Tenovin-1 und den HDACi auf den RETRA-induzierten Zelltod in der p53-mutierten Zelllinie SK-ES-1 zu untersuchen, wurden zum Nachweis des Zelltodes zytometrische Analysen und der Caspase-3-Aktivitätstest durchgeführt.

5.1.1. Zelltodbestimmung mittels Durchflusszytometrie

Nach der Behandlung mit RETRA wurden die Zellen für 48 h im Brutschrank belassen und anschließend am Durchflusszytometer die Integrität der Zellmembran mittels PI-Messung und das mitochondriale Membranpotenzial gemessen. Die Ergebnisse sind in Abbildung 5-1 dargestellt. Es zeigte sich ein konzentrationsabhängiger Anstieg toter Zellen bei alleiniger RETRA-Behandlung. Die zusätzliche Applikation von 0,5 µM SAHA bewirkte einen weiteren Anstieg des Zelltodes im Sinne einer synergistischen Wirkung. Im Vergleich dazu fand durch die Applikation von Tenovin-1 eine Abschwächung des RETRA-induzierten Zelltodes statt.

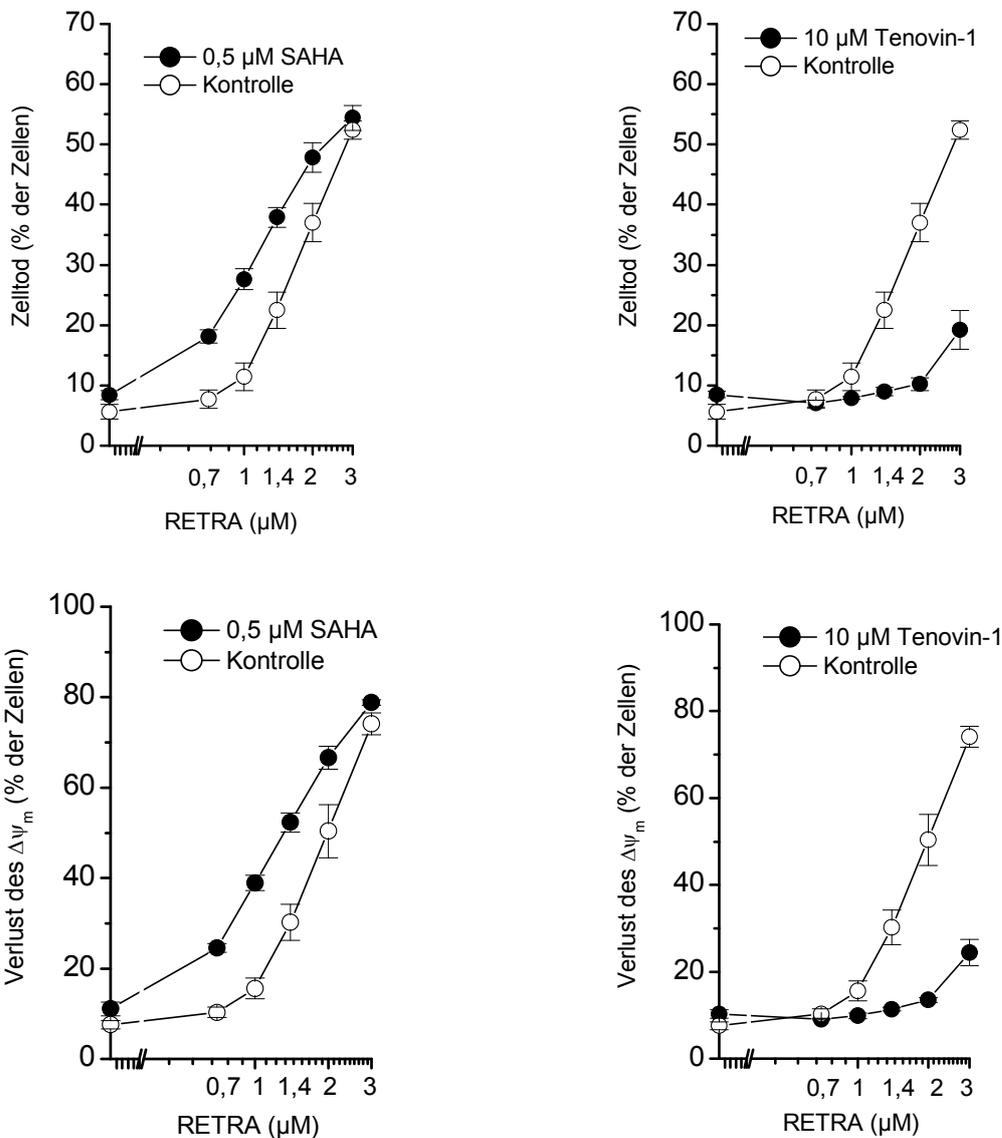


Abbildung 5-1: Zelltod-Analyse von Tenovin-1 und SAHA in Kombination mit RETRA in SK-ES-1-Zellen. 4 h nach der Behandlung mit SAHA bzw. Tenovin-1 wurden die Zellen für weitere 48 h mit RETRA inkubiert. Die Bestimmung der toten Zellen wurde am Durchflusszytometer mittels PI-Aufnahme und Bestimmung des mitochondrialen Membranpotenzials mittels $\text{DIOC}_6(3)$ gemessen. Angegeben sind Mittelwert \pm Standardabweichung von drei Experimenten.

Durch die alleinige Tenovin-1-Behandlung entstand unabhängig von der verabreichten Konzentration keine Auswirkung auf den Zelltod. Durch Kombination von 2 μM RETRA mit Tenovin-1 konnte der Zelltod abgeschwächt werden. Hingegen trat durch die alleinige Applikation von MS-275 eine dosisabhängige Steigerung des Zelltodes auf. MS-275 in Kombination mit 2 μM RETRA führte zu einem additiven Effekt der zytotoxischen Wirkung (siehe unten Abbildung 5-2).

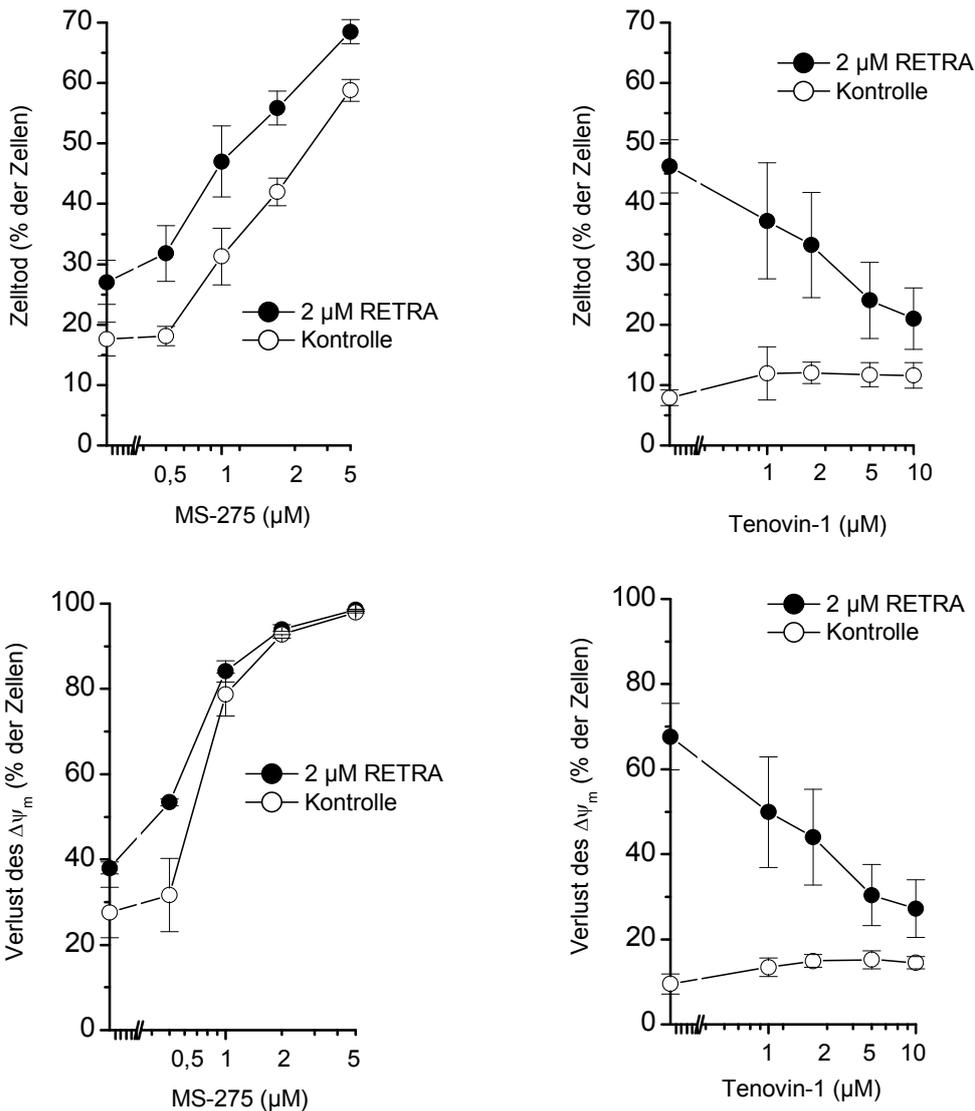


Abbildung 5-2: Zelltod-Analyse von Tenovin-1 und MS-275 in Kombination mit RETRA in SK-ES-1-Zellen. 4 h nach der Behandlung mit MS-275 bzw. Tenovin-1 wurden die Zellen für weitere 48 h mit RETRA inkubiert. Der Anteil der toten Zellen wurde durch zytometrische Messungen mittels PI-Aufnahme und Bestimmung des mitochondrialen Membranpotenzials mithilfe des Fluoreszenzfarbstoffs $DIOC_6(3)$ ermittelt. Angegeben sind Mittelwert \pm Standardabweichung von drei Experimenten.

5.1.2 Bestimmung der subG₁-Fraktion des Zellzyklus

Die Analyse des Zellzyklus diente zur Darstellung des Apoptose-abhängigen Zelltodes. Apoptotische Zellen enthalten durch die Fragmentation der DNA die geringste DNA-Menge im Zellkern im Vergleich zu Zellen in den anderen Zellzyklusphasen. Die Einlagerung des verwendeten Fluoreszenzfarbstoffes PI ist dabei proportional zur DNA-Menge, wodurch der Anteil der toten Zellen in der subG₁-

Fraktion dargestellt wird. Die alleinige aufsteigende Tenovin-1-Behandlung (1-10 μM) zeigte auch mit dieser Methode keine Auswirkung auf den Zelltod. Hingegen erwies sich durch die Kombination des Sirtuininhibitors Tenovin-1 mit 2 μM RETRA die bereits beschriebene Abschwächung des Zelltodes (Abbildung 5-3). Weitere Effekte auf die restlichen Zellzyklusphasen durch Tenovin-1 in Kombination mit 2 μM RETRA im Sinne eines Zellzyklusarrestes konnten nicht beobachtet werden, weshalb die entsprechenden grafischen Darstellungen nicht aufgeführt sind.

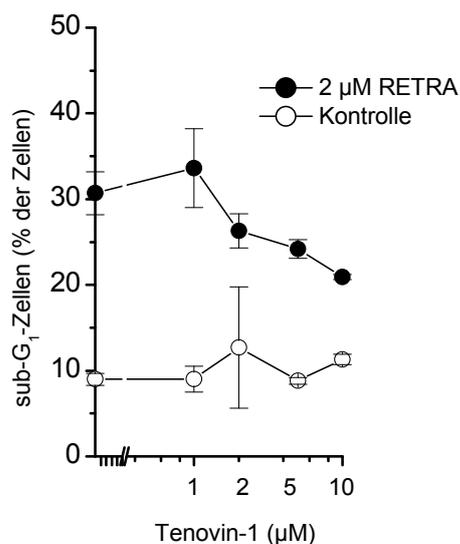


Abbildung 5-3: Abschwächung des zytotoxischen Effektes durch Kombination von RETRA und Tenovin-1 in SK-ES-1-Zellen. 4 h nach der Behandlung mit Tenovin-1 wurden die Zellen für weitere 48 h mit RETRA inkubiert. Die Bestimmung der subG₁-Fraktion erfolgte durch die zytometrische Messung nach PI-Färbung. Angegeben sind Mittelwert \pm Standardabweichung von drei Experimenten.

5.1.3 Analyse der Caspase-3-Aktivität

Die mögliche Induktion der Apoptose durch die Kombination von RETRA mit den HDACi bzw. Tenovin-1 wurde des Weiteren durch die Messung der Caspase-3-Aktivität überprüft. In apoptotischen Zellen kann eine gesteigerte Aktivität der Caspase-3 bestimmt und quantifiziert werden.

Nach einer 24-stündigen Inkubation zeigte sich bei der aufsteigenden RETRA-Reihe eine konzentrationsabhängige Verstärkung der Caspase-3-Aktivität. In Kombination mit 0,5 μM SAHA konnte eine weitere Zunahme beobachtet werden. Ein synergistischer Effekt wird vor allem bei niedrigen RETRA-Konzentrationen ersichtlich.

Durch die Behandlung von RETRA in Verbindung mit 10 μM Tenovin-1 wurde hingegen eine erhebliche Abnahme der Enzymaktivität und damit eine Abschwächung des zytotoxischen Effektes von RETRA sichtbar.

Bei der Variation des Behandlungsschemas zeigte sich durch die alleinige Applikation von Tenovin-1 unabhängig von der Konzentration keine Änderung der Caspase-3-Aktivität (Abbildung 5-4). Möglicherweise wird die Enzymaktivität durch Tenovin-1 gehemmt bzw. der Sirtuininhibitor hat keinen Einfluss auf die Caspase-3. In Verbindung mit 2 μM RETRA hingegen nahm die enzymatische Aktivität dosisabhängig ab und entspricht damit einem antagonistischen Effekt.

Die alleinige Applikation von MS-275 (0,5- 5 μM) bewirkte konzentrationsabhängig einen Anstieg der Enzymaktivität, der durch die Kombination mit 2 μM RETRA noch verstärkt wurde.

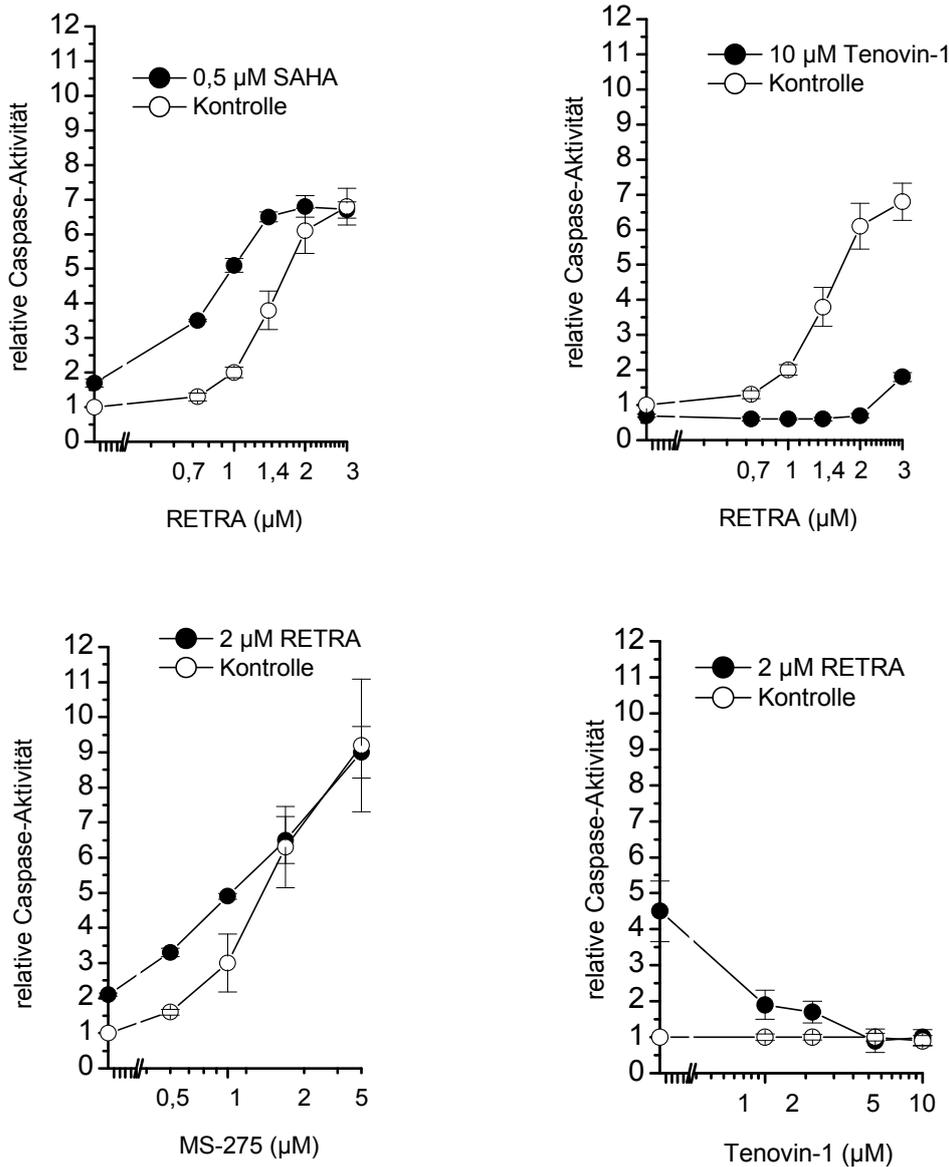


Abbildung 5-4: Wirkung von SAHA, MS-275 und Tenovin-1 in Kombination mit RETRA auf die Caspase-3-Aktivität in SK-ES-1-Zellen.

4 h nach der Behandlung mit SAHA, MS-275 bzw. Tenovin-1 wurden die Zellen für weitere 24h mit RETRA inkubiert. Die Caspase-3-Aktivität wurde am Fluoreszenzphotometer ermittelt. Die relative Caspase-3-Aktivität errechnete sich aus dem Verhältnis von behandelten und unbehandelten Zellen. Angegeben sind Mittelwert \pm Standardabweichung von drei Experimenten.

Zusammenfassend wurde sowohl in den zytometrischen Methoden und in der Messung der Caspase-3-Aktivität ein deutlich gesteigerter zytotoxischer Effekt der Kombinationsbehandlung von RETRA mit den HDACi SAHA und MS-275 in der mtp53-Zelllinie SK-ES-1 im Sinne einer Verstärkung des Zelltodes verzeichnet. Der Sirtuininhibitor Tenovin-1 führte dagegen zu einer Abschwächung des RETRA-induzierten Zelltodes.

5.2 Wirkung von Tenovin-1 im Vergleich mit den HDACi SAHA und MS-275 in RD-ES-Zellen

Um die Effekte der HDACi und Tenovin-1 auf den RETRA-induzierten Zelltod in einer weiteren mtp53- Zelllinie zu untersuchen bzw. zu bestätigen, wurden die bereits beschriebenen Behandlungsschemata und verwendeten experimentellen Methoden zur Untersuchung der Zytotoxizität in RD-ES-Zellen durchgeführt. Dabei sind im Folgenden nicht alle, sondern lediglich ausgewählte Ergebnisse zur Unterstützung der bereits beschriebenen Wirkungen der verwendeten Substanzen in den SK-ES1-Zellen aufgeführt.

5.2.1 Zelltodbestimmung mittels Durchflusszytometrie

Die Messung der PI-Aufnahme und des mitochondrialen Membranpotenzials bestätigen den dosisabhängigen Anstieg des Zelltodes durch eine alleinige RETRA-Behandlung. Die Zugabe von 0,5 μ M SAHA führte zu einer weiteren Verstärkung im Sinne einer additiven Wirkweise. Des Weiteren bewirkte die alleinige Applikation von MS-275 eine dosisabhängige Steigerung der Anzahl toter Zellen. Ebenso konnte der additive Effekt bei der Kombination von MS-275 mit 2 μ M RETRA in der mtp53-Zelllinie RD-ES bestätigt werden (siehe Abbildung 5-5).

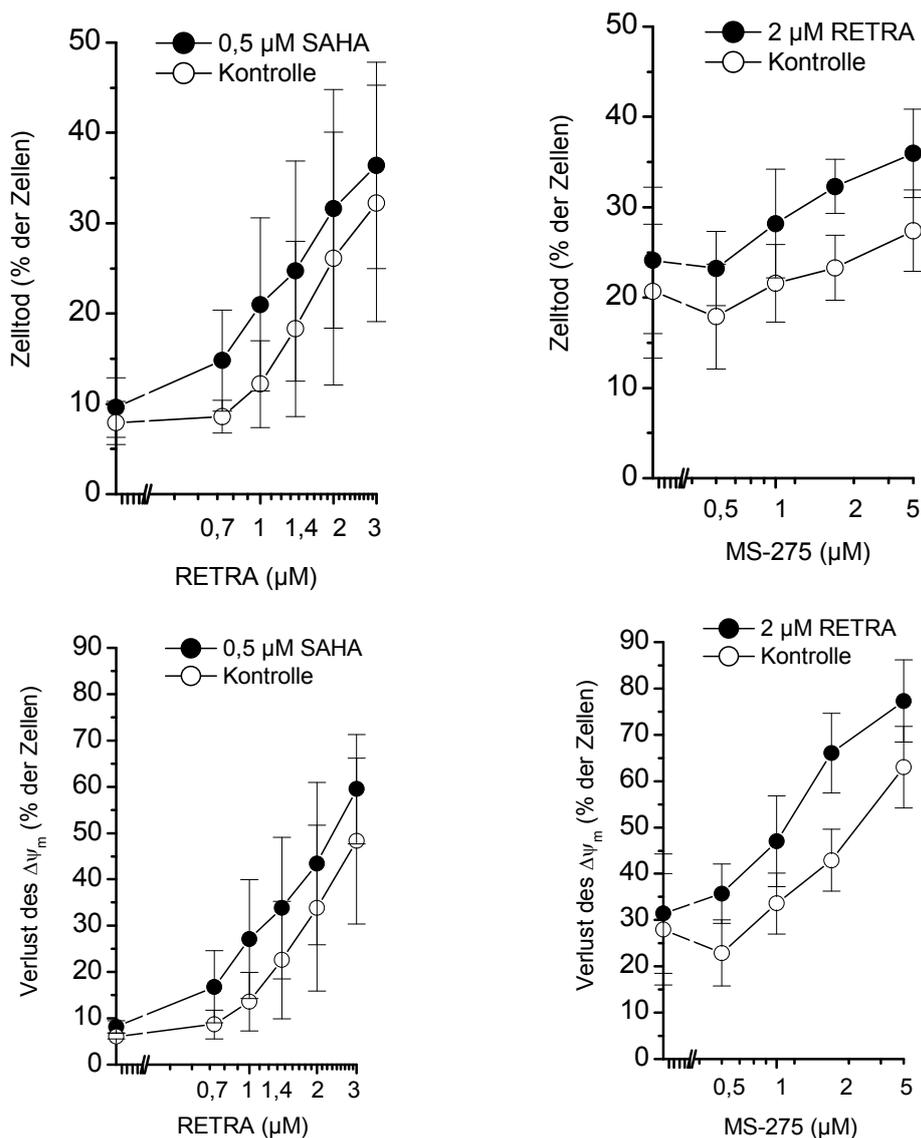


Abbildung 5-5: Zelltodanalyse der Kombination der HDACi SAHA und MS-275 mit RETRA in RD-ES-Zellen. 4 h nach der Behandlung mit SAHA bzw. MS-275 wurden die Zellen für weitere 48 h mit RETRA inkubiert. Die Analyse des Anteils der toten Zellen erfolgte am Durchflusszytometer mittels PI-Aufnahme und Bestimmung des mitochondrialen Membranpotenzials mittels DIOC₆(3). Angegeben sind Mittelwert \pm Standardabweichung von drei Experimenten.

5.2.2 Analyse der Caspase-3-Aktivität

Die Wirkung von Tenovin-1 auf die Apoptose wurde durch die Messung der Caspase-3-Aktivität mit Gegenüberstellung von MS-275 durchgeführt. In der folgenden Abbildung (5-6) wird ersichtlich, dass Tenovin-1 in alleiniger Behandlung keine Auswirkung auf die enzymatische Aktivität besitzt. Die Kombination mit 2 μM RETRA führte jedoch zu einer dosisabhängigen Abschwächung des durch RETRA-induzierten Anstiegs der Enzymaktivität.

Hingegen steigerte die MS-275-Behandlung konzentrationsabhängig die Caspase-3-Aktivität. In Kombination mit 2 μM RETRA konnte diese Wirkung überdies verstärkt und als synergistischer Effekt erfasst werden.

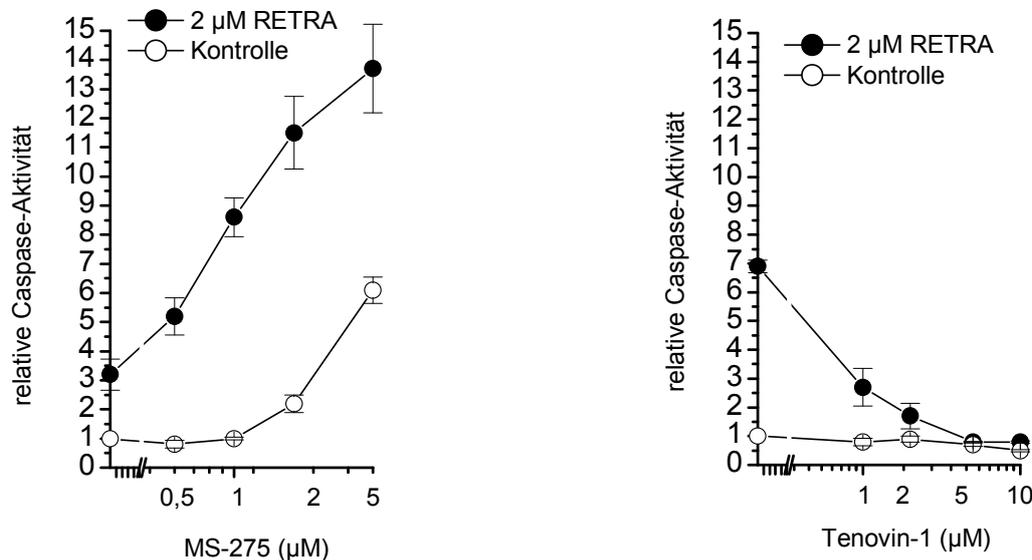


Abbildung 5-6: Wirkung von Tenovin-1 und MS-275 in Kombination mit RETRA auf die Caspase-3-Aktivität in RD-ES-Zellen. 4 h nach der Behandlung mit MS-275 bzw. Tenovin-1 wurden die Zellen für weitere 48 h mit RETRA inkubiert. Die Messung der Caspase-3-Aktivität erfolgte am Fluoreszenzphotometer. Die relative Caspase-3-Aktivität errechnete sich aus dem Verhältnis von behandelten und unbehandelten Zellen. Angegeben sind Mittelwert \pm Standardabweichung von drei Experimenten.

5.3 Wirkung von Tenovin-1 im Vergleich mit den HDACi SAHA und MS-275 in SK-N-MC-Zellen

Nach Kravchenko et al. 2008 entfaltet RETRA seine Wirkung lediglich in mtp53-Zellen, indem es die Interaktion zwischen mtp53 und p73 unterbindet und p73 seine antineoplastische Aktivität wieder erlangt. Die Analyse des Zelltodes in der p53-Null-Zelllinie SK-N-MC sollte in diesem Zusammenhang Aufschluss über die Abhängigkeit der verwendeten Substanzen von dem Tumorsuppressor p53 und den Wirkmechanismus von RETRA geben.

5.3.1 Zelltodbestimmung mittels Durchflusszytometrie

Entgegen den Behauptungen von Kravchenko et al. 2008 zeigte sich in den zytometrischen Methoden eine deutliche zytotoxische Wirkung von RETRA in der p53-Null-Zelllinie. Diese war dosisabhängig und wurde durch die zusätzliche Applikation von 0,5 μM SAHA verstärkt.

Die Behandlung mit 10 μM Tenovin-1 hingegen schwächte den RETRA-induzierten Zelltod konstant sowohl in der Messung der PI-Aufnahme als auch bei der Bestimmung des mitochondrialen Membranpotenzials ab (siehe unten Abbildung 5-7).

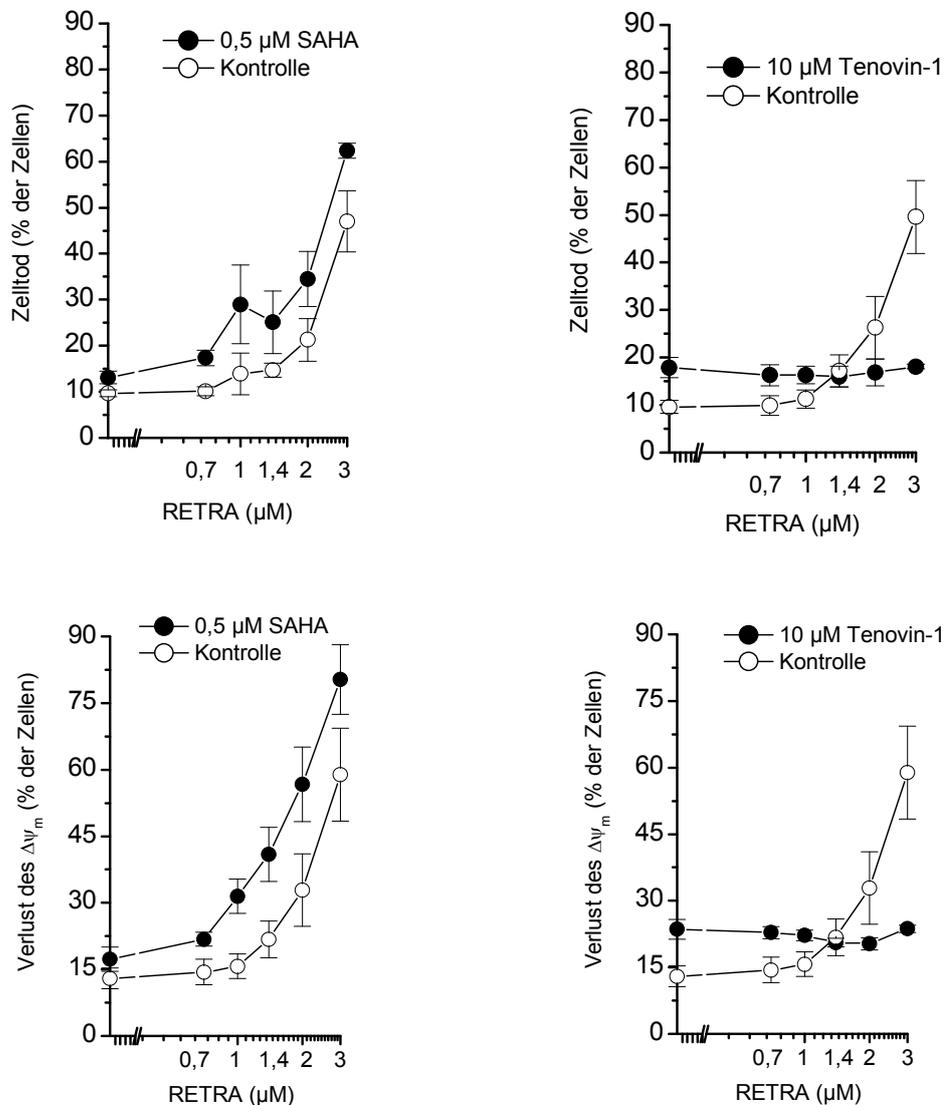


Abbildung 5-7: Zelltodbestimmung nach Behandlung mit Tenovin-1 und SAHA in Kombination mit RETRA in SK-N-MC-Zellen.

4 h nach der Behandlung mit SAHA bzw. Tenovin-1 wurden die Zellen für weitere 48 h mit RETRA inkubiert. Die zytometrischen Messungen erfolgten mittels PI-Aufnahme und Bestimmung des mitochondrialen Membranpotenzials mittels $\text{DIOC}_6(3)$. Angegeben sind Mittelwert \pm Standardabweichung von drei Experimenten.

In den zytometrischen Messungen zeigte sich in den SK-N-MC-Zellen außerdem eine konzentrationsabhängige Zunahme des Zelltodes durch MS-275. Durch die zusätzliche Gabe von 2 μM RETRA ließ sich eine weitere Verstärkung des Zelltodes

nachweisen. Es zeigte sich somit ein synergistischer Effekt von MS-275 in Kombination mit RETRA (Abbildung 5-8).

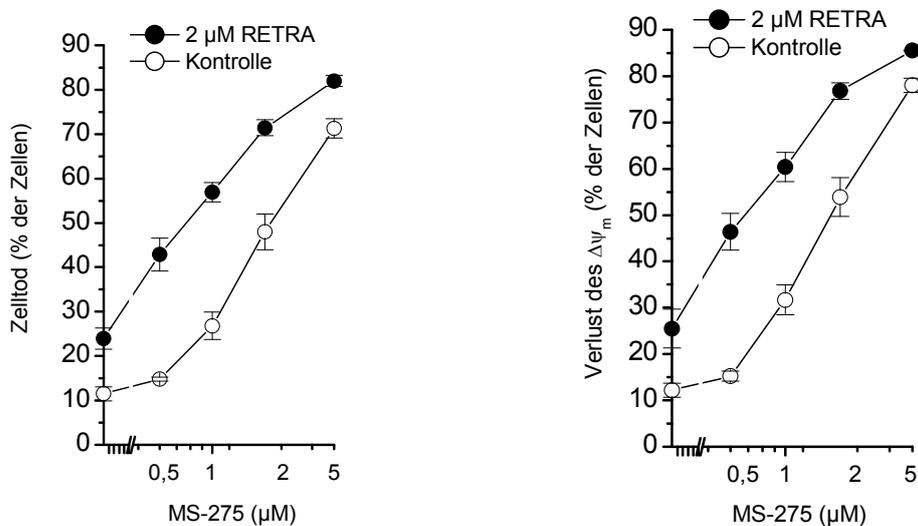


Abbildung 5-8: Zelltodanalyse nach Behandlung mit MS-275 in Kombination mit RETRA in SK-N-MC-Zellen. 4 h nach der Behandlung mit MS-275 wurden die Zellen für weitere 48 h mit RETRA inkubiert. Die zytometrischen Messungen erfolgten mittels PI-Aufnahme und Bestimmung des mitochondrialen Membranpotenzials mittels DIOC₆(3). Angegeben sind Mittelwert ± Standardabweichung von drei Experimenten.

5.3.2 Bestimmung der subG₁-Fraktion des Zellzyklus

Die Messung der subG₁-Fraktion mittels PI-Färbung diente zur Überprüfung der Apoptose-abhängigen Wirkmechanismen von MS-275 und Tenovin-1 bzw. der Kombination mit RETRA. Hierbei konnte sowohl die alleinige konzentrationsabhängige Steigerung der Apoptose durch MS-275 als auch die weitere Verstärkung in Kombination mit 2 μM RETRA bestätigt werden.

Tenovin-1 führte in alleiniger Behandlung wie bereits auch in den mtp53-Zelllinien zu keiner Änderung der subG₁-Population, weshalb Tenovin-1 selbst vermutlich keine zytotoxische Wirkung besitzt. Der Zelltod-abschwächende Effekt des Sirtuininhibitor Tenovin-1 in Kombination mit RETRA, der bereits mithilfe der PI-Aufnahme und DIOC₆(3)-Messung erfasst wurde, stellte sich auch mittels der Zellzyklusanalyse in Abbildung 5-9 dar.

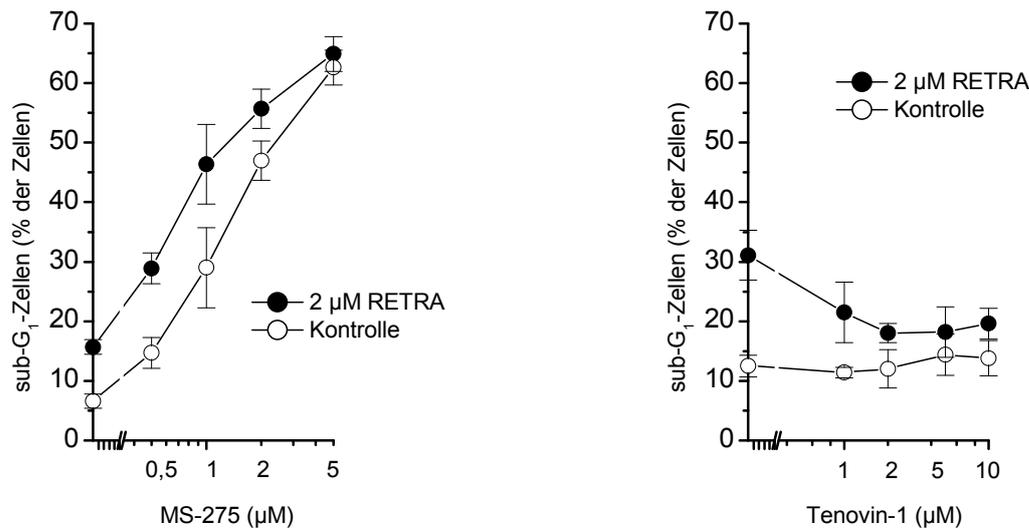


Abbildung 5-9: Analyse der subG₁-Fraktion nach Applikation von Tenovin-1 und MS-275 in Kombination mit RETRA in SK-N-MC-Zellen. 4 h nach der Behandlung mit MS-275 bzw. Tenovin-1 wurden die Zellen für weitere 48 h mit RETRA inkubiert. Die zytometrische Analyse der toten Zellen als subG₁-Zellen erfolgte mittels PI-Färbung. Angegeben sind Mittelwert ± Standardabweichung von drei Experimenten.

5.3.3 Analyse der Caspase-3-Aktivität

Die Induktion der Apoptose durch RETRA in der p53-Null-Zelllinie SK-N-MC konnte durch den Aktivitätstest der Caspase-3 bestätigt werden. Es zeigte sich ein deutlicher konzentrationsabhängiger Anstieg der enzymatischen Aktivität. Durch die Kombination mit 0,5 µM SAHA konnte dieser Effekt von RETRA verstärkt werden.

Die zusätzliche Applikation von 10 µM Tenovin-1 führte zu einer deutlichen Abnahme der Enzymaktivität.

Im variierten Behandlungsschema bewirkte die alleinige Tenovin-1-Applikation konzentrationsunabhängig keine Aktivierung der Caspase-3. Jedoch bestätigte die Kombination mit 2 µM RETRA die Ergebnisse des ersten Behandlungsschemas, indem eine deutliche konzentrationsabhängige Abschwächung auftrat.

Die Behandlung mit MS-275 allein zeigte eine dosisabhängige Zunahme der Enzymaktivität, die durch Kombination mit RETRA verstärkt wurde (siehe Abbildung 5-10).

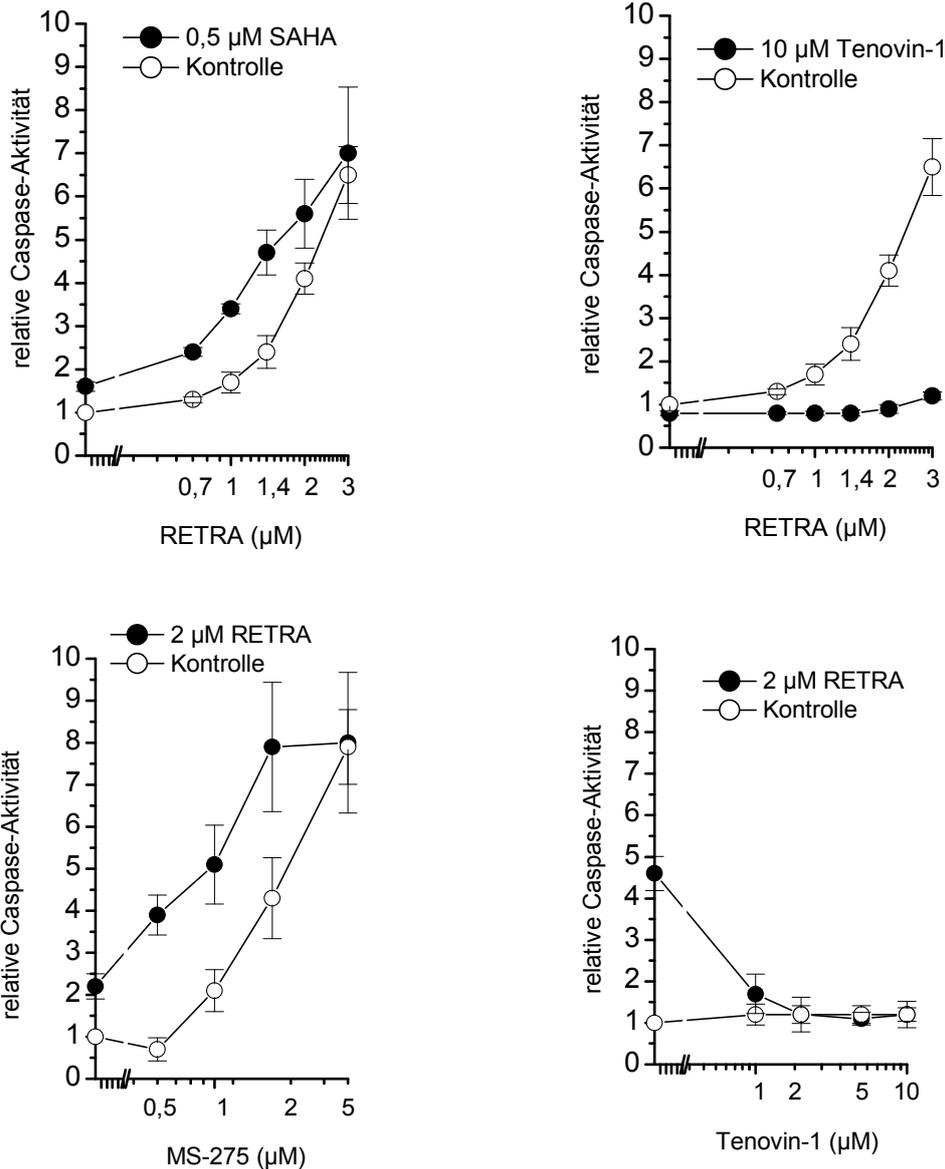


Abbildung 5-10: Wirkung von Tenovin-1 und den HDACi in Kombination mit RETRA auf die Caspase-3-Aktivität in SK-N-MC-Zellen. 4 h nach der Behandlung mit SAHA, MS-275 bzw. Tenovin-1 wurden die Zellen für weitere 24 h mit RETRA inkubiert. Die Bestimmung der enzymatischen Aktivität erfolgte am Fluoreszenzphotometer. Die relative Caspase-3-Aktivität errechnete sich aus dem Verhältnis von behandelten und unbehandelten Zellen. Angegeben sind Mittelwert \pm Standardabweichung von drei Experimenten.

5.4 Wirkung von Tenovin-1 im Vergleich mit den HDACi SAHA und MS-275 in WE-68-Zellen

Um die Wirkung der HDACi und Tenovin-1 auf den RETRA-induzierten Zelltod in Anwesenheit von Wildtyp-p53 zu untersuchen, wurden die bereits angewandten experimentellen Methoden in der Zelllinie WE-68 durchgeführt. Jedoch wurde die Konzentration von Tenovin-1 reduziert, da sich eine starke Toxizität ab einer

Konzentration von 5 μM einstellte und zu schwer interpretierbaren Ergebnissen geführt hätte. In den WE-68-Zellen wurde mit 0,5 μM Tenovin-1 vorbehandelt, um ein optimales Dosis-Wirkungsverhältnis mit Vermeidung der Eigentoxizität von Tenovin-1 zu gewährleisten. Möglicherweise stellt der Wildtyp-p53-Status eine Ursache für die verstärkte Toxizität von Tenovin-1 dar, wobei anzumerken ist, dass in einer weiteren Wildtyp-p53-Zelllinie, CADO-ES1, die Behandlung mit 10 μM eine geringere Zytotoxizität zeigte. Es scheinen demnach besondere zelluläre Prozesse der WE-68-Zellen eine Rolle zu spielen. Die restlichen Konzentrationen von RETRA als auch den HDACi konnten beibehalten werden. Im Folgenden sind ausgewählte Ergebnisse der Experimente mit den WE-68-Zellen aufgeführt.

5.4.1 Zelltodbestimmung mittels Durchflusszytometrie

Die zytometrische Analyse des Zelltodes zeigte entgegen den Aussagen von Kravchenko et al. 2008 eine erhebliche zytotoxische Wirkung von RETRA in der Wildtyp-p53-Zelllinie. Dieser Effekt war dosisabhängig und konnte durch die Behandlung mit dem HDACi SAHA zusätzlich gesteigert werden. Somit konnte ein additiver Effekt beobachtet werden.

Der Sirtuininhibitor Tenovin-1 führte in Kombination mit RETRA, im Unterschied zu den vorherigen Zelllinien, lediglich zu einer geringen Abnahme des RETRA-induzierten Zelltodes. Bis zu einer Konzentration von 1 μM RETRA ergab sich keine Verschiedenheit zwischen der Kontrollkurve und der Kombinationskurve (Abbildung 5-11). Möglicherweise ist die verwendete Tenovin-1-Konzentration zu gering bzw. es zeigt sich der zytotoxische Effekt von Tenovin-1 in den WE-68-Zellen.

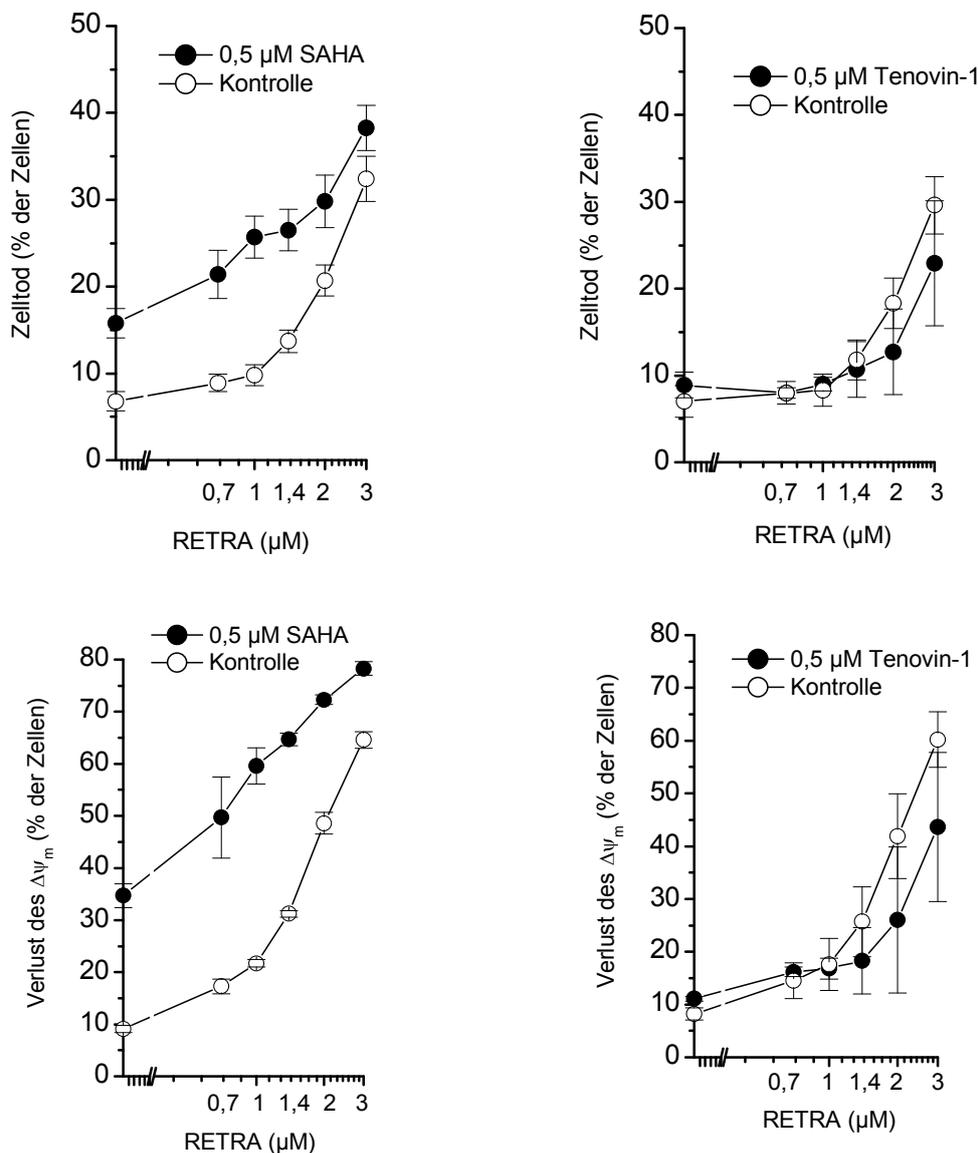


Abbildung 5-11: Wirkung von SAHA und Tenovin-1 auf den RETRA-induzierten Zelltod in WE-68-Zellen. 4 h nach der Behandlung mit SAHA bzw. Tenovin-1 wurden die Zellen für weitere 48 h mit RETRA inkubiert. Die Bestimmung des Anteils toter Zellen erfolgte durch die zytometrische Messung der PI-Aufnahme und mittels Analyse des mitochondrialen Membranpotenzials mittels $\text{DIOC}_6(3)$. Angegeben sind Mittelwert \pm Standardabweichung von drei Experimenten.

Desweiteren zeigte sich in dem variierten Behandlungsschema, dass MS-275 zu einem konzentrationsabhängigen Anstieg der Population der toten Zellen führte. Die Zugabe von 2 μM RETRA bewirkte eine Steigerung des Zelltodes und offenbarte, wie in Abbildung 5-12 ersichtlich, einen additiven Effekt durch die Kombinationsbehandlung.

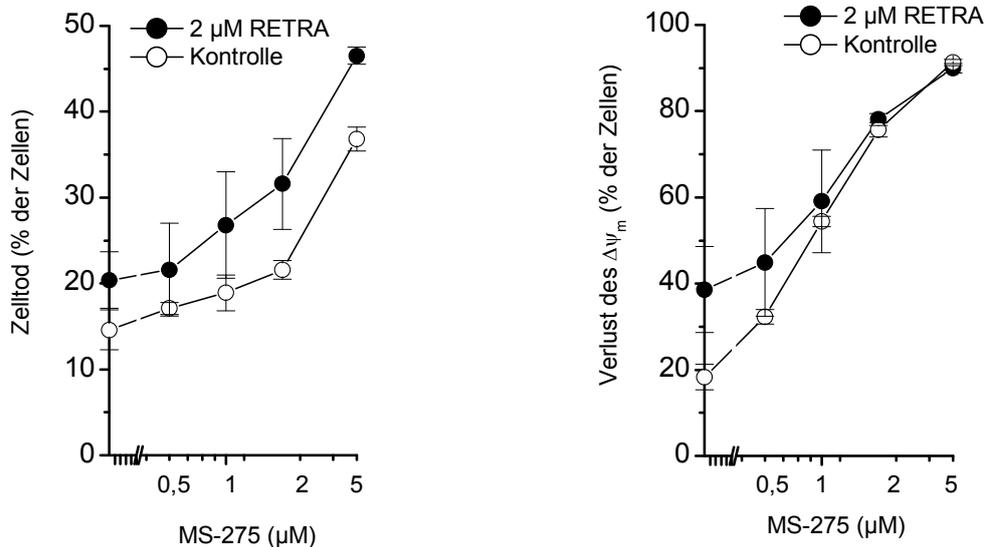


Abbildung 5-12: Zelltodanalyse unter Behandlung von MS-275 und RETRA in WE-68-Zellen. 4 h nach der Behandlung mit MS-275 wurden die Zellen für weitere 48 h mit RETRA inkubiert. Die zytometrische Messung erfolgte mittels PI-Aufnahme und Bestimmung des mitochondrialen Membranpotenzials mittels DIOC₆(3). Angegeben sind Mittelwert \pm Standardabweichung von drei Experimenten.

5.4.2 Bestimmung der subG₁-Fraktion des Zellzyklus

Die Steigerung des Zelltodes und dabei der Apoptose durch MS-275 und die Kombinationsbehandlung mit RETRA wurde mittels Zellzyklus-Analyse bestätigt. Hierbei konnte ein dosisabhängiger Anstieg der subG₁-Zellen durch eine alleinige MS-275-Applikation ermittelt werden. Durch die Kombination mit 2 μM RETRA zeigte sich eine vermehrte Zunahme im Sinne der Apoptoseinduktion (Abbildung 5-13).

Da weitere Auswirkungen auf die restlichen Zellzyklusphasen nicht auftraten, sind die entsprechenden Darstellungen nicht aufgeführt.

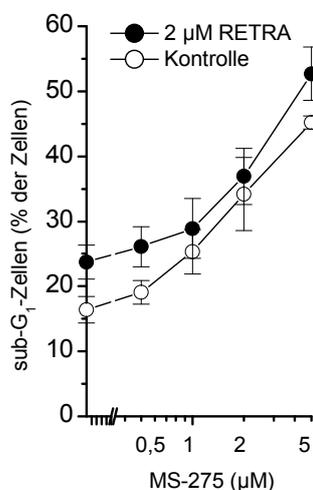


Abbildung 5-13: Beeinflussung der subG₁-Fraktion durch MS-275 und RETRA in WE-68-Zellen. 4 h nach der Behandlung mit MS-275 wurden die Zellen für weitere 48 h mit RETRA

inkubiert. Die zytometrische Analyse des Zellzyklus erfolgte mittels PI-Einfärbung. Angegeben sind Mittelwert \pm Standardabweichung von drei Experimenten.

5.4.3 Analyse der Caspase-3-Aktivität

Zur weiteren Untersuchung des Wirkmechanismus wurde der Caspase-3-Aktivitätstest durchgeführt. Die Aktivität der Caspase-3, die als Effektorcaspase an der Apoptose beteiligt ist, konnte bereits bei alleiniger MS-275-Behandlung dosisabhängig gesteigert werden. Darüber hinaus zeigte sich eine Zunahme in Kombination mit 2 μ M RETRA (siehe nachfolgende Abbildung 5-14).

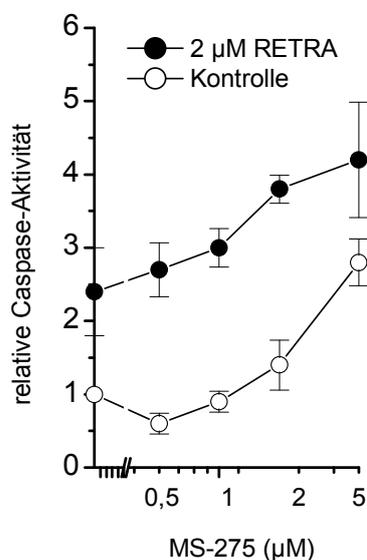


Abbildung 5-14: Steigerung der Caspase-3-Aktivität durch Kombination von RETRA und MS-275 in WE-68-Zellen. 4 h nach der Behandlung mit MS-275 wurden die Zellen für weitere 24 h mit RETRA inkubiert. Die enzymatische Aktivität wurde am Fluoreszenzphotometer gemessen. Die relative Caspase-3-Aktivität errechnete sich aus dem Verhältnis von behandelten und unbehandelten Zellen. Angegeben sind Mittelwert \pm Standardabweichung von drei Experimenten.

5.5 Wirkung von Tenovin-1 im Vergleich mit den HDACi SAHA und MS-275 in CADO-ES1-Zellen

Als weitere p53-Wildtyp-Zelllinie wurden CADO-ES1-Zellen verwendet. Allerdings zeigte sich in der experimentellen Arbeit, dass diese sehr sensibel auf äußere Einflüsse reagierten bzw. auch einige Methoden, wie die Bestimmung des mitochondrialen Membranpotenzials mittels DIOC₆(3), keine auswertbaren Ergebnisse ergaben. Deshalb ist lediglich die zytometrische Messung der PI-Aufnahme im nachfolgenden Abschnitt aufgeführt.

5.5.1 Zelltodbestimmung mittels Durchflusszytometrie

Ergänzend zu den Ergebnissen der Wildtyp-p53-Zelllinie WE-68 zeigte sich der anscheinend vom p53-Status unabhängige zytotoxische Effekt von RETRA. Durch die Kombination mit 0,5 μM SAHA konnte eine additive Steigerung des RETRA-induzierten Zelltodes in Abhängigkeit von der Konzentration beobachtet werden.

Die alleinige Behandlung mit einer aufsteigenden Tenovin-1-Reihe führte im Gegensatz zu den vorherigen Zelllinien zu einer Zunahme des Anteils der toten Zellen. Die Applikation von 2 μM RETRA bewirkte eine Abnahme des Zelltodes (Abbildung 5-15). Tenovin-1 scheint in den beiden verwendeten Wildtyp-p53-Zelllinien eine größere Eigentoxizität bei alleiniger Applikation zu entfalten. In Kombination mit RETRA zeigte sich in beiden Wildtyp-p53-Zelllinien im Vergleich mit den mt- und Null-p53-Zelllinien, eine geringere Abschwächung des Zelltodes.

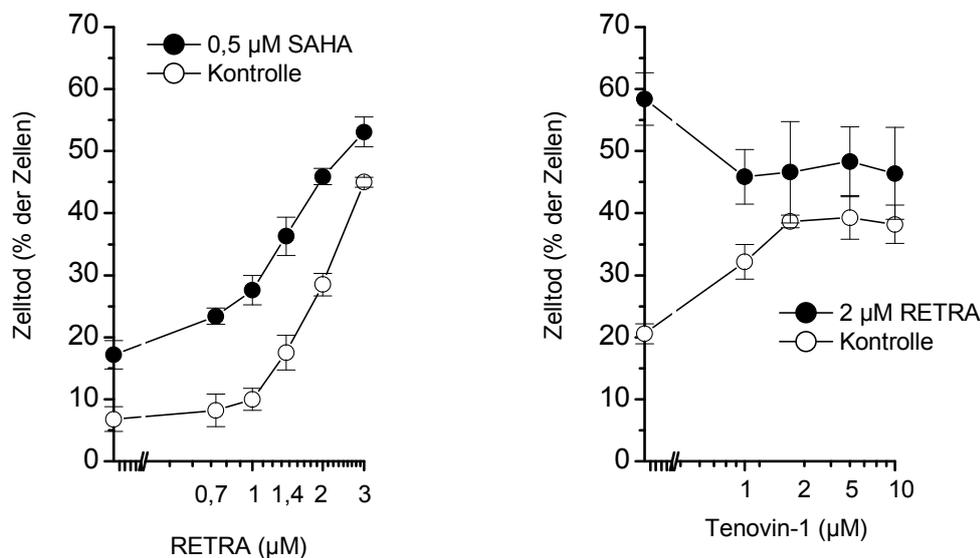


Abbildung 5-15: Zelltodanalyse von SAHA und Tenovin-1 in Kombination mit RETRA in CADO-ES1-Zellen. 4 h nach der Behandlung mit SAHA bzw. Tenovin-1 wurden die Zellen für weitere 48 h mit RETRA inkubiert. Die Analyse des Zelltodes und Bestimmung des Anteils toter Zellen erfolgte durch die zytometrische Messung der PI-Aufnahme. Angegeben sind Mittelwert \pm Standardabweichung von drei Experimenten.

5.6 p21-Genexpressionsanalysen mittels „Real time“ RT-PCR (TaqMan®)

Um die Wirkungsweise des Sirtuininhibitors Tenovin-1 und der HDACi allein und in Kombination mit RETRA zu untersuchen, wurde eine Genexpressionsanalyse des CDK-Inhibitors p21 durchgeführt. p21, als wichtiger Regulator der Zellzykluskontrolle, ist ein Zielgen des Tumorsuppressorproteins p53. Durch die vermehrte

transkriptionelle Induktion von p21 findet ein Zellzyklusarrest statt (Gartel and Radhakrishnan 2005, el-Deiry et al. 1993). Ebenso aktiviert p73 die Transkription von p53-relevanten Zielgenen, dabei auch p21 (Zhu et al. 1998, Yang et al. 2002). Der Nachweis einer vermehrten Induktion von p21 in Ewing-Sarkom-Zellen mit unterschiedlichem p53-Status kann einen Hinweis auf den Wirkmechanismus im Zusammenhang mit den Tumorsuppressorproteinen p53 und p73 ermöglichen.

Die Analyse der Genexpression beinhaltete neben der Isolation der RNA der behandelten Zellen das Umschreiben mithilfe einer Reversen Transkriptase in cDNA. Anschließend konnte diese cDNA in der „Real time“ RT-PCR amplifiziert werden. Durch die relativ-quantitative Messung der mRNA wurde die Expressionsstärke eines Gens, hier des p21, ermittelt. Zur Auswertung diente die Berechnung mit der $\Delta\Delta C_T$ -Methode, die Unterschiede der Expressionsstärke in Relation zu einem Referenzgen aufzeigt. In dieser Forschungsarbeit wurde das $\beta 2M$ -Gen als Referenzgen verwendet.

In den nachfolgenden Abbildungen sind die $\Delta\Delta C_T$ -Werte im Sinne der relativen p21-mRNA-Expression dargestellt. Die Kontrolle wurde jeweils gleich 1 gesetzt und diente damit als Vergleich für die Genexpression.

Die Ewing-Sarkom-Zellen wurden mit 0,5 μM SAHA, 10 μM Tenovin-1 bzw. 5 μM RETRA allein behandelt und nach 24 h geerntet. Im Kombinationsfall wurden 4 h nach der Applikation von SAHA bzw. Tenovin-1 5 μM RETRA hinzugegeben, um so die Wirkung der kombinierten Substanzen auf die Genexpression zu untersuchen.

5.6.1 p21-Genexpressionsanalyse in mtp53-Zellen

In der Zelllinie SK-ES-1, die eine Mutation des p53 aufweist, zeigte sich eine deutliche Induktion von p21 durch 0,5 μM SAHA. Hingegen entstand durch die alleinige Applikation von 10 μM Tenovin-1 keine Änderung der relativen mRNA-Expression. Durch die alleinige Behandlung mit RETRA hingegen zeigte sich eine starke Induktion des p21, die durch die Kombination mit 0,5 μM SAHA gesteigert wurde. In Kombination mit dem Sirtuininhibitor Tenovin-1 wurde die Genexpression im Vergleich zur alleinigen RETRA-Applikation deutlich abgeschwächt (Abbildung 5-16), welches mit den bereits dargestellten Ergebnissen der zytometrischen Analysen übereinstimmte (Abschnitt 5.1).

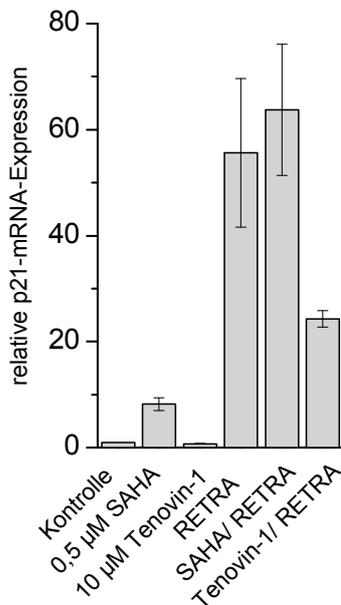


Abbildung 5-16: Vergleich der relativen p21-mRNA-Expression in SK-ES-1-Zellen.

Die Messung der p21-Genexpression wurde mittels „Real time“ RT-PCR gemessen und mithilfe der $\Delta\Delta C_T$ -Methode berechnet. Angegeben sind relative p21-mRNA-Expression \pm Standardabweichung von zwei Experimenten.

Zur Bestätigung der RT-PCR-Ergebnisse in einer weiteren mtp53- Zelllinie, wurde die Behandlung an RD-ES-Zellen durchgeführt. Hierbei zeigte sich, in Abbildung 5-17 ersichtlich, eine ähnliche Zunahme der relativen mRNA-Expression durch die alleinige Behandlung mit 0,5 µM SAHA und 5 µM RETRA. Die alleinige Tenovin-1-Applikation zeigte im Vergleich mit der Kontrolle keine Veränderung der relativen mRNA-Expression. Durch die Kombination von RETRA mit SAHA wurde eine Steigerung um das 50-fache im Vergleich zur Kontrolle ermittelt. Hingegen fand durch die Kombination von RETRA mit Tenovin-1 eine Abnahme der relativen mRNA-Expression im Vergleich zur alleinigen RETRA-Behandlung statt.

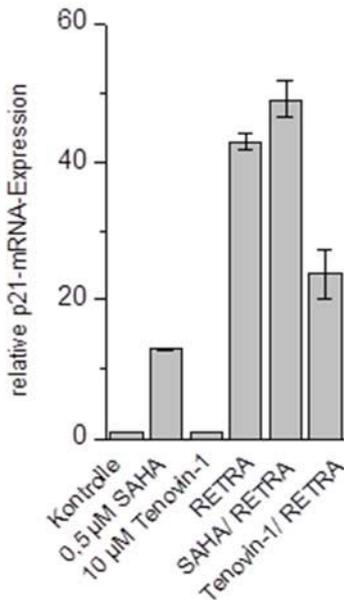


Abbildung 5-17: Vergleich der relativen p21-mRNA-Expression in RD-ES-Zellen.

Die Messung der p21-Genexpression wurde mittels „Real time“ RT-PCR ermittelt und mithilfe der $\Delta\Delta C_T$ -Methode berechnet. Angegeben sind relative p21-mRNA-Expression \pm Standardabweichung von zwei Experimenten.

5.6.2 p21-Genexpressionsanalyse in Nullp53-Zellen

In der p53-Null-Zelllinie SK-N-MC stellte sich durch die alleinige Applikation von 0,5 μ M SAHA eine Steigerung der Genexpression von p21 dar (Abbildung 5-18). Im Vergleich dazu konnte durch den Sirtuininhibitor Tenovin-1 keine Änderung der Genexpression festgestellt werden. Durch die alleinige Behandlung mit 5 μ M RETRA entstand eine circa 90-fache Steigerung der Genexpression im Vergleich zur Kontrolle. Eine weitere Zunahme konnte in Verbindung mit 0,5 μ M SAHA beobachtet werden. Im Gegensatz hierzu fand durch die Kombinationsbehandlung mit 10 μ M Tenovin-1 in Gegenüberstellung mit der alleinigen RETRA-Behandlung eine starke Abnahme der Genexpression des p21 statt.

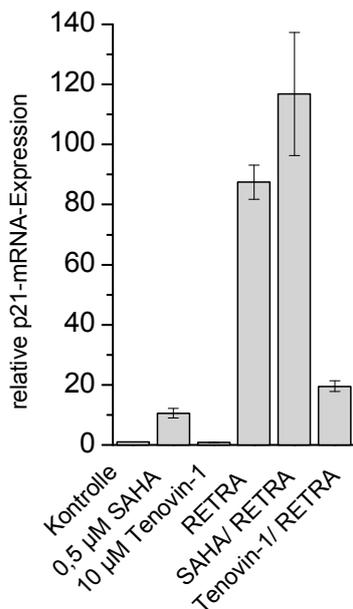


Abbildung 5-18: Vergleich der relativen p21-mRNA-Expression in SK-N-MC-Zellen.

Die Messung der p21-Genexpression wurde mittels „Real time“ RT-PCR ermittelt und mithilfe der $\Delta\Delta C_T$ -Methode berechnet. Angegeben sind relative p21-mRNA-Expression \pm Standardabweichung von zwei Experimenten.

5.6.3 p21-Genexpressionsanalyse in p53-Wildtyp-Zellen

In der untersuchten Zelllinie WE-68 musste, wie bereits bei den vorherigen Analysemethoden des Zelltodes, eine geringere Konzentration von Tenovin-1 zur Behandlung verwendet werden. Die normalerweise für die Genanalysen verwendete Konzentration von 10 μ M Tenovin-1 wurde auf 0,5 μ M reduziert.

Im Vergleich zur Kontrolle zeigte sich in den WE-68-Zellen eine geringe Expressionsverstärkung durch die alleinige Behandlung mit SAHA. Im Gegensatz dazu führte die alleinige Tenovin-1-Behandlung zu einer stärkeren Zunahme der relativen mRNA-Expression. Die alleinige Applikation von 5 μ M RETRA ließ die p21-Genexpression um das Fünffache im Vergleich zur Kontrolle ansteigen. Durch das Zufügen von 0,5 μ M SAHA erfolgte eine weitere Steigerung. Die Kombination mit 0,5 μ M Tenovin-1 führte zu einer Abnahme der relativen mRNA-Expression im Vergleich zur alleinigen RETRA-Behandlung (Abbildung 5-19).

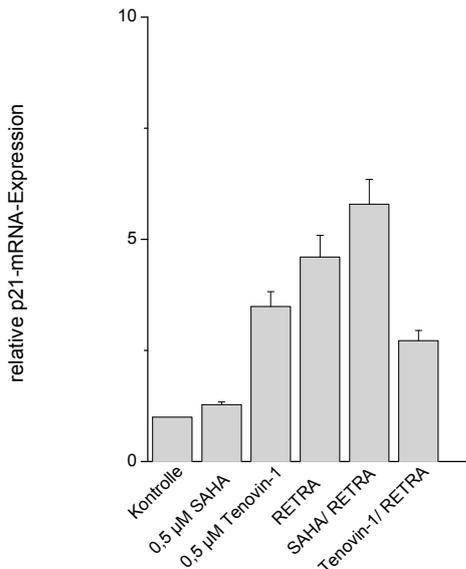


Abbildung 5-19: Vergleich der relativen p21-mRNA-Expression in WE-68-Zellen.

Die Messung der p21-Genexpression wurde mittels „Real time“ RT-PCR ermittelt und mithilfe der $\Delta\Delta C_T$ -Methode berechnet. Angegeben sind relative p21-mRNA-Expression \pm Standardabweichung von zwei Experimenten.

In der anderen p53-Wildtyp-Zelllinie, CADO-ES1, fiel vor allem der starke Anstieg der p21-Genexpression durch die alleinige Tenovin-1-Applikation im Vergleich zur Kontrolle auf (Abbildung 5-20). In Kombination mit 5 μ M RETRA fand ebenfalls eine vermehrte Expression statt, jedoch geringer als bei der alleinigen Tenovin-1-Behandlung von 10 μ M. Ebenso konnte durch die Behandlung mit 0,5 μ M SAHA, 5 μ M RETRA und der Kombination aus beiden eine vermehrte Expression der p21-mRNA festgestellt werden.

Möglicherweise ist die Existenz des Wildtyp-p53 für die Induktion des p21 durch Tenovin-1 in beiden Wildtyp-p53-Zelllinien von Bedeutung. In den zuvor beschriebenen Zelllinien, die entweder ein mutiertes bzw. kein p53 enthielten, war eine Induktion der relativen p21-mRNA-Expression durch alleinige Tenovin-1-Gabe nicht zu beobachten.

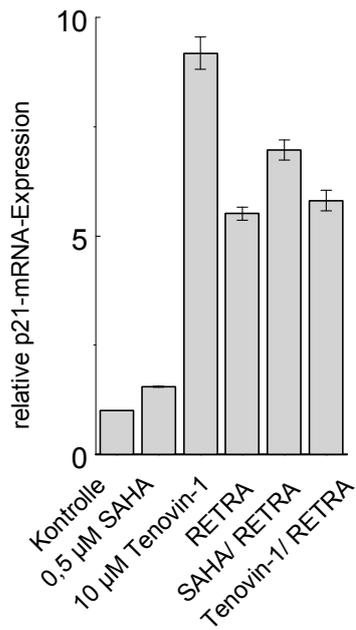


Abbildung 5-20: Vergleich der relativen p21-mRNA-Expression in CADO-ES1-Zellen.

Die Messung der p21-Genexpression wurde mittels „Real time“ RT-PCR ermittelt und mithilfe der $\Delta\Delta C_T$ -Methode berechnet. Angegeben sind relative p21-mRNA-Expression \pm Standardabweichung von zwei Experimenten.

6. Diskussion

Die Einführung einer Kombinationstherapie hat in den letzten Jahrzehnten eine deutliche Verbesserung des progressionsfreien Überlebens beim Ewing-Sarkom mit sich gebracht. Allerdings besitzen Patienten mit bereits metastasierter Tumorerkrankung zum Diagnosezeitpunkt weiterhin nur ein Überleben von maximal 30% (Cotterill et al. 2000). Es bedarf demnach der intensiven Forschung nach neuen Antitumorthérapien für die Behandlung dieser seltenen Neoplasie. In diesem Zusammenhang wurde in der vorliegenden Arbeit die Kombination von HDACi strukturell-unterschiedlicher Klassen mit dem p53-Aktivator RETRA untersucht.

Hierbei wurden Ewing-Sarkom-Zellen mit unterschiedlichem p53-Status mit RETRA behandelt, um die Frage einer Abhängigkeit von dem Tumorsuppressorprotein zu erforschen. Bei circa der Hälfte der humanen Tumoren können p53-Mutationen nachgewiesen werden, wobei diese bei kindlichen Tumorerkrankungen jedoch selten auftreten (Neilsen et al. 2011). Lediglich bei 10% der Patienten mit Ewing-Tumoren finden sich p53-Mutationen, die jedoch schlecht auf Chemotherapie ansprechen (Neilsen et al. 2011, de Alava et al. 2000). Hierbei stellt RETRA eine neue Substanz dar, die die Interaktion zwischen mtp53 und p73 inhibiert, wodurch das freie p73 seine Tumorsuppressoraktivität entfalten kann. Somit werden durch das freie p73 p53-relevante Zielgene, wie p21 and PUMA aktiviert (Zhu et al. 1998, Yang et al. 2002). Anders als in der Arbeit von Kravchenko et al. 2008 führte RETRA in den durchgeführten zytometrischen Analysen nicht nur in den mutierten (SK-ES1, RD-ES), sondern auch in Null-p53 (SK-N-MC) und Wildtyp-p53-Zellen (CADO-ES1, WE-68) zur Auslösung des Zelltodes. Die zytotoxische Wirkung von RETRA zeigte sich somit unabhängig vom p53-Status. Möglicherweise wird p73 unabhängig von der Anwesenheit von p53 induziert und führt somit zur transkriptionellen Aktivierung p53-relevanter Zielgene. Zum Nachweis des Wirkmechanismus der Tumorsuppressorproteine p53 und p73 wurden in allen Zelllinien p21-Genexpressionsanalysen mittels „Real time“ RT-PCR durchgeführt. p21 ist ein Zielgen des Tumorsuppressorproteins p53 und wichtiger Regulator der Zellzykluskontrolle, indem es einen Zellzyklusarrest herbeiführt (Gartel and Radhakrishnan 2005). Es zeigte sich eine deutliche Induktion der relativen p21-mRNA-Menge in allen Zelllinien. Möglicherweise ist diese Induktion auf eine Aktivität des p73 zurückzuführen, da der Effekt in allen Zelllinien unabhängig vom Vorhandensein des p53 auftrat. p73 ist zudem ein evolutionär älterer

Transkriptionsfaktor, der durch dieselben funktionellen Domänen wie p53 charakterisiert ist (Yang et al 2002). In-vivo-Versuche mit Mäusen, denen die TAp73-Isoform fehlt, offenbaren eine erhöhte genomische Instabilität gefolgt von einer erhöhten Rate an spontanen Tumoren, was die Relevanz von p73 im Rahmen der Malignomentstehung unterstützt (Lunghi et al. 2009). Nach Irwin et al. 2003 kann TAp73 durch eine Vielzahl von Chemotherapeutika induziert werden. Ein Blockieren der Funktion dieser Isoform bewirkt in humanen Tumoren und in Zellkulturen mit Wildtyp-, Null- und inaktivem p53 eine verstärkte Chemoresistenz.

Zur Untersuchung einer möglichen Verstärkung des RETRA-induzierten Zelltodes schlossen sich die Kombinationsbehandlungen mit den HDACi an. Eine Kombinationsbehandlung mit diesen neuen antineoplastischen Substanzen erscheint aus vielerlei Hinsicht erfolgversprechend. HDACi lösen, im Gegensatz zu den bisher angewendeten Chemotherapeutika, keinen direkten Zellschaden aus, sondern agieren vielmehr über eine epigenetische Modulation von Histonen und Nicht-Histon-Proteinen in der Krebszelle. Sie vermögen auf diese Weise durch direkte oder indirekte Signalwege den programmierten Zelltod oder Wachstumsarrest der Krebszelle auszulösen (Xu et al. 2007). Neuere Forschungsergebnisse zeigen außerdem, dass genetische Veränderungen nicht allein als einzige Ursache für die Entstehung verschiedener Tumorarten und deren unterschiedlichen Phänotypen verantwortlich sein können (Esteller 2008). In diesem Sinne lässt sich die Sinnhaftigkeit einer möglichen HDACi-Therapie von Malignomen ableiten, da epigenetische Prozesse im Gegensatz zu Mutationen reversibel sind (Esteller 2008, Bernstein et al. 2007). Des Weiteren gibt es Hinweise, dass die HDACi die Wirksamkeit der herkömmlichen Behandlungsformen wie Strahlen- und Chemotherapie verstärken und Resistenzmechanismen von Krebszellen überwinden können (Sonnemann et al. 2006). Die Arbeitsgruppe von Professor Beck untersuchte in diesem Rahmen bereits Kombinationsbehandlungen der HDACi und den gebräuchlichen Chemotherapeutika an verschiedenen kindlichen Tumorerkrankungen. Beispielsweise wurden Medulloblastomzellen einzeln mit den HDACi oder in Kombination mit ionisierender Strahlung, Zytostatika oder TRAIL behandelt. Als HDACi kamen SAHA, Natriumbutyrat und Trichostatin A zur Anwendung. Mittels zytometrischer Analysen und Bestimmung der Caspase-9 und -3-Aktivität konnte eine Induktion der Apoptose bei allen Einzelbehandlungen mit den HDACi gezeigt werden. Darüber hinaus wurde der zytotoxische Effekt von

ionisierender Strahlung, dem Zytostatikum Etoposid und TRAIL durch die Kombination noch deutlich verstärkt (Sonnemann et al. 2006). Diese Ergebnisse geben bereits einen Ausblick auf die Wirksamkeit der Monotherapie bzw. Kombination herkömmlicher Therapien mit den HDACi.

In der vorliegenden Forschungsarbeit wurde der Einfluss der HDACi SAHA und MS-275 auf den RETRA-induzierte Zelltod untersucht. Um die Abhängigkeit der Effekte von p53 unter den Kombinationsbehandlungen zu evaluieren, wurden Ewing-Sarkom-Zellen mit unterschiedlichem p53-Status verwendet. Die Rolle des Tumorsuppressorproteins p53 im Zusammenhang mit der antitumoralen Wirkung der HDACi ist zum derzeitigen Erkenntnisstand weiterhin umstritten. Während einige Studien eine Unabhängigkeit von p53 nahelegen, bestehen andere wiederum auf der Abhängigkeit von p53. Condorelli et al. 2008 beobachteten eine Acetylierung und damit Aktivierung des p53 durch HDACi in Neuroblastomzellen, wodurch der mitochondriale Signalweg der Apoptose ausgelöst wurde. Zum Nachweis der möglichen Steigerung der RETRA-Zytotoxizität durch die HDACi wurden durchflusszytometrische Methoden, wie die Messung des mitochondrialen Membranpotenzials und der PI-Aufnahme, sowie die Bestimmung der Caspase-3-Aktivität verwendet.

In allen Zelllinien wurde bei der Kombination von 0,5 μM SAHA mit der aufsteigenden RETRA-Reihe (0,7-3 μM) ein dosisabhängiger Verlust des Membranpotenzials ermittelt, was als Ausdruck einer Induktion des intrinsischen Weges der Apoptose zu werten ist. Durch die gesteigerte Aktivität der Caspase-3 konnte die Auslösung des programmierten Zelltodes durch die Kombination von RETRA mit SAHA verifiziert werden. Diese Ergebnisse stehen im Einklang mit dem Befund, dass SAHA seine Wirkung durch die Auslösung der Apoptose entfaltet (Duvic und Vu 2007, Sonnemann et al. 2006).

Ein variiertes Behandlungsschema mit einer aufsteigenden MS-275-Reihe (0,5-5 μM) und Zugabe von 2 μM RETRA sollte Aufschluss über die Kombination mit einem weiteren, strukturell verschiedenen HDACi geben. In den zytometrischen Messungen der PI-Aufnahme und des mitochondrialen Membranpotenzials offenbarte sich in allen verwendeten Zelllinien eine konzentrationsabhängige Zunahme des RETRA-induzierten Zelltodes durch die Behandlung mit MS-275. Die Zunahme der Aktivität der Caspase-3 unter der Kombinationsbehandlung mit MS-275 bestätigte des Weiteren die Verstärkung des Zelltodes. Vorangegangene Forschungsarbeiten um

Professor Beck zeigten bereits die Aktivierung des mitochondrialen Weges der Apoptose und eine geringe Induktion der Caspase-9 und -3 durch MS-275 (Sonnemann et al. 2007). Diese Resultate offenbaren eine deutliche Steigerung des RETRA-induzierten Zelltodes durch SAHA und MS-275 unabhängig vom p53-Status. Dies bestätigt vorherige Ergebnisse der Arbeitsgruppe von Professor Beck, wobei SAHA p53 in Kolonkarzinomzellen aktiviert, allerdings das Vorhandensein von p53 nicht für eine zytotoxische Wirkung von SAHA nötig ist (Sonnemann et al. 2013).

Zur Aufklärung eines möglichen Wirkmechanismus der verwendeten Kombinationsbehandlungen wurden p21-Genexpressionsanalysen mittels „Real time“ RT-PCR durchgeführt. Um die Abhängigkeit von p53 zu ermitteln, wurden die bereits erwähnten Zelllinien mit unterschiedlichem p53-Status ausgewählt. Die alleinige Applikation von 0,5 μ M SAHA führte in allen Zelllinien unabhängig vom p53-Status zu einer vermehrten Expression der p21-mRNA. Durch die Kombination von 5 μ M RETRA und 0,5 μ M SAHA konnte eine Tendenz zur Zunahme der p21-Expression in allen Zelllinien beobachtet werden. Hierbei ist anzumerken, dass p21 eines der häufig von HDACi induzierten Zielgene ist, welches unabhängig von p53 induziert wird (Minucci und Pelicci 2006). Vermutlich verstärken die HDACi die RETRA-Wirkung somit über einen Mechanismus, der eine Funktionsfähigkeit des p53 nicht voraussetzt, aber sich deutlich auf die Genexpression auswirkt. An dieser Stelle muss außerdem auf die pleiotropen Wirkmechanismen der HDACi hingewiesen werden, die bei Weitem nicht vollständig aufgeklärt sind. Neben der Auslösung des Zelltodes auf vielfältige Weise führen sie zu Zellzyklusarrest, zur Akkumulation von ROS und Inhibition von DNA-Reparaturmechanismen. Sie entfalten antiinvasive, -angiogenetische Effekte und besitzen immunmodulatorische Aktivität je nach Zelltyp (Minucci und Pelicci 2006). Die Verstärkung der Zytotoxizität von RETRA durch die verwendeten HDACi beruht möglicherweise auf einer Potenzierung der Effekte von p73 und weiteren zellspezifischen Signalwegen. So hemmt beispielsweise MS-275 das Zellwachstum durch die Wiederherstellung des TGF- β -Signalweges in Ewing-Sarkom-Tumorzellen (Jaboin et al. 2002).

Neben den Histondeacetylasen spielen die Sirtuine in der epigenetischen Modifikation von Histonen und Nicht-Histon-Proteinen eine entscheidende Rolle (Xu et al. 2007). SIRT1 vermag p53 zu binden und zu deacetylieren und damit dessen Fähigkeit zur Induktion von Apoptose und Zellzyklusarrest zu unterbinden (Yi und Luo 2010, Michishita et al. 2005, Bosch-Presegué und Vaquero 2011). In SIRT1-

defizienten Thymozyten konnte ein deutlicher Anstieg der p53-induzierten Apoptose nach Bestrahlung nachgewiesen werden. Dai et al. 2007 berichten, dass SIRT1 auch p73 deacetyliert und dadurch dessen proapoptotische Aktivität vermindert. In diesem Zusammenhang sollte eine weitere Kombinationsbehandlung mit dem kleinmolekularen SIRTi Tenovin-1 Aufschluss geben, ob der durch RETRA ausgelöste Zelltod verstärkt werden kann. Tenovin-1 hemmt vor allem die SIRT1 und führt dadurch zur Acetylierung und Aktivierung von p53 (Lain et al. 2008).

Die alleinige Applikation einer aufsteigenden Tenovin-1-Reihe (1-10 μM) bewirkte jedoch keine Auslösung der Apoptose. In allen Zelllinien unabhängig vom p53-Status zeigte Tenovin-1 in den zytometrischen Analysen sowie dem Caspase-3-Aktivitätstest keinen Effekt auf den Zelltod.

In der Kombination einer aufsteigenden RETRA-Reihe (0,7-3 μM) mit 10 μM Tenovin-1 in den mtp53-Zelllinien (SK-ES1 und RD-ES) trat in den zytometrischen Analysen eine deutliche Reduktion des RETRA-induzierten Zelltodes auf. Mithilfe eines variierten Behandlungsschemas sollte dieser Effekt validiert werden. Hierfür wurden die Zellen mit einer aufsteigenden Tenovin-1-Reihe (1-10 μM) vorbehandelt und 2 μM RETRA hinzugegeben. Die beobachtete konzentrationsabhängige Abschwächung der RETRA-Wirkung durch Tenovin-1 konnte ebenfalls mittels zytometrischer Methoden festgestellt werden. Außerdem diente die Zellzyklusanalyse zur Evaluierung der Apoptoseabhängigkeit. Hierbei zeigte sich eine dosisabhängige Abnahme der subG1-Fraktion, was Ausdruck für eine verminderte Apoptose ist. Des Weiteren stellte sich eine reduzierte Aktivität der Caspase-3 unter der Kombinationsbehandlung dar. Die zytometrischen Messungen der PI-Aufnahme, des Zellzyklus und des mitochondrialen Membranpotenzials wurden außerdem in der Null-p53-Zelllinie SK-N-MC durchgeführt und offenbarten ebenfalls eine Antagonisierung des RETRA-induzierten Zelltodes durch Tenovin-1.

Die Wirkung der Kombinationsbehandlung auf den RETRA-induzierten Zelltod bei Wildtyp-p53 sollte durch die Verwendung der Zelllinien WE-68 und CADO-ES1 untersucht werden. Da die WE-68-Zellen empfindlicher auf die Behandlung mit Tenovin-1 reagierten, wurde die Konzentration des SIRTi auf eine Konzentration von 0,5 μM reduziert. Hierbei zeigte sich in den zytometrischen Analysen bei beiden verwendeten Wildtyp-p53-Zellen eine geringere Abschwächung des RETRA-induzierten Zelltodes im Vergleich zu den vorherigen Zelllinien.

Zur Aufklärung eines möglichen Wirkmechanismus wurden auch hier die p21-Genexpressionsanalysen durchgeführt. Durch die alleinige Behandlung mit 10 μ M Tenovin-1 zeigte sowohl in den mtp53- und Null-p53-Zellen keine Induktion des p21. Durch die Kombination mit 5 μ M RETRA jedoch wurde die Expression deutlich abgeschwächt. In den zwei Wildtyp-Zelllinien führte die ausschließliche Zugabe von 0,5 μ M Tenovin-1 zu einer Verstärkung der relativen p21-mRNA-Expression. Die Kombination mit 5 μ M RETRA bewirkte hingegen eher eine Abnahme der p21-Induktion. Es zeigte sich somit durch die alleinige Behandlung mit Tenovin-1 in den p53-Wildtyp-, jedoch nicht in den mt- und Null-p53-Zellen, eine deutliche Auswirkung auf der Genexpressionsebene.

Diese ermittelten Ergebnisse der Kombinationsbehandlung mit dem SIRTi Tenovin-1 lassen Raum für vielfältige Spekulationen. Die Bedeutung der Sirtuine im Rahmen der Tumorentstehung ist umstritten. Je nach Tumorart, zellulärem Kontext und betroffenem Signalweg bewirken sie Tumorsuppression oder –promotion (Sebastián et al. 2012, Yuan et al. 2013). Beispielweise ist SIRT1 in Brust-, Prostata- und Lungenkrebs sowie einer Vielzahl weiterer Tumoren überexprimiert und teilweise mit einem ungünstigen klinischen Verlauf und Prognose assoziiert. In Weichgewebe-Sarkomen ist SIRT1 häufig exprimiert und wird als möglicher immunhistochemischer Marker diskutiert (Yuan et al. 2013). Nach Bosch-Presegué und Vaquero 2011 führt die Deacetylierung von p53 durch SIRT1 zur verminderten Funktion des Tumorsuppressorproteins und damit zur Hemmung der Apoptose. Die Sirtuine würden somit tumorfördernd wirken. Nach dieser Theorie müsste aus der Behandlung mit SIRTi Tenovin-1 eine vermehrte Induktion der Apoptose resultieren. Die Ergebnisse der durchgeführten vielfältigen Zelltodanalysen in allen Zelllinien sprechen jedoch dagegen. Lediglich die gesteigerte Induktion des p21 durch die alleinige Tenovin-1-Applikation als Ausdruck der p53-Funktion in den Wildtyp-p53-Zellen könnte die behauptete onkogene Funktion der Sirtuine unterstützen.

Allerdings gibt es Hinweise, dass beispielsweise SIRT1 als Antwort auf DNA-Schäden auch DNA-Reparatur und Zellüberleben fördern kann. Interaktionen mit Transkriptionsfaktoren (wie FOXO, NF- κ B), p53 und den Sirtuinen beeinflussen zusätzlich diese Signalwege (Bosch-Presegué und Vaquero 2011). Diese Hypothese erscheint unter Betrachtung der Abschwächung des RETRA-induzierten Zelltodes durch Tenovin-1 als mögliche Erklärung.

Zu diskutieren ist die Rolle weiterer beteiligter Sirtuine, da Tenovin-1 neben dem wichtigen SIRT1 auch das zytoplasmatische SIRT2 hemmt. SIRT1 und SIRT2 sind an der Regulation von p53 und sogar p73 beteiligt (Dai et al. 2007, Bosch-Presegué und Vaquero 2011). Nach Yuan et al. 2013 scheint SIRT2, ähnlich dem SIRT1, sowohl eine tumorsuppressive als auch fördernde Wirkung zu besitzen. Sirtuine fördern somit nicht generell das Zellüberleben, denn unter chronischem Stress vermögen SIRT1 und 2 (siehe nachfolgende Abbildung 6-1) Seneszenz und Apoptose auszulösen (Bosch-Presegué und Vaquero 2011). Sie würden auf diese Weise tumorsuppressiv wirken.

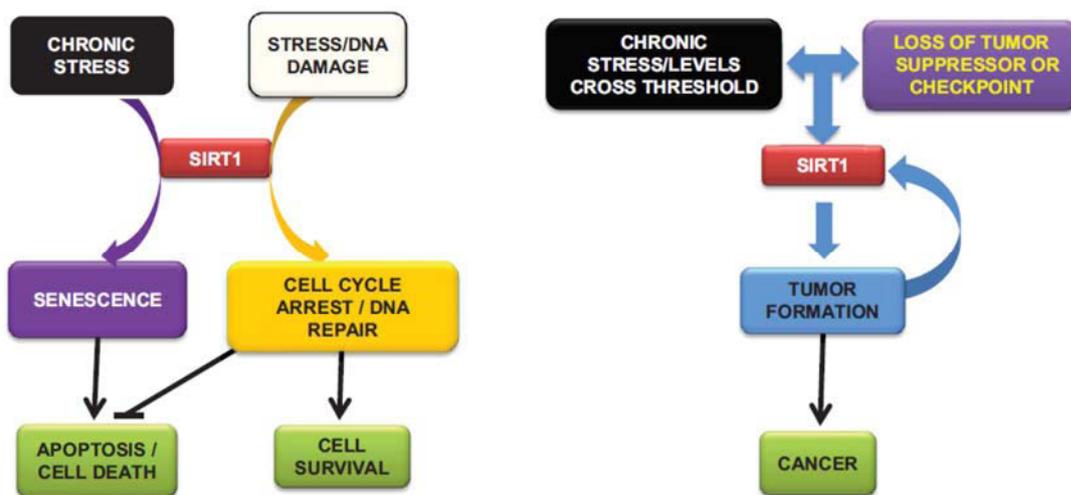


Abbildung 6-1: Darstellung der dualen Rolle von SIRT1 (Bosch-Presegué und Vaquero 2011).

Das Ergebnis dieser Forschungsarbeit, die Zelltod-abschwächende Wirkung von Tenovin-1, lässt einen solchen Effekt der Sirtuine in Ewing-Sarkom-Zellen vermuten. Schließlich wurde durch die Behandlung mit Tenovin-1 unabhängig vom p53-Status der RETRA-induzierte Zelltod vermindert. In den mutierten und Null-p53-Zellen wurde des Weiteren auch keine Induktion des p21 durch die alleinige Applikation von Tenovin-1 festgestellt. Möglicherweise können die Effekte durch Tenovin-1 Signalwegen der Sirtuine zugeschrieben werden, die unabhängig von p53 ablaufen. Darüber hinaus sollte die jeweilige Tumorentität nicht unbeachtet bleiben, da in humanen Tumoren häufig eine Überexpression von Sirtuinen, besonders SIRT1, beobachtet wurde (Deng 2009). SIRT1 galt deshalb lange Zeit als Tumorpromotor. Hierbei bleibt jedoch zu klären, ob die Überexpression eine Ursache der

Tumorentstehung oder eine Folge dessen darstellt. Schließlich konnte auch eine verminderte SIRT1-Expression in einer Vielzahl von anderen Tumoren bestätigt werden (Deng 2009). Im Falle des Ewing-Sarkoms wäre eine Untersuchung der Sirtuin-Expression notwendig, auch im Hinblick auf eine genaue Aussage über die Wirkungsweise des SIRTi Tenovin-1.

Zusammenfassend kann festgehalten werden, dass die Wirkung von RETRA in den Ewing-Sarkom-Zellen über den von Kravchenko et al. 2008 beschriebenen Effekt hinausgeht. Hierbei konnte der Zelltod nicht nur in mtp53-, sondern auch in Wildtyp- und Null-p53-Zellen ausgelöst werden. Dieser RETRA-induzierte Zelltod wurde durch die verwendeten HDACi SAHA und MS-275 in allen Zelllinien verstärkt. Folglich kann eine p53-unabhängige Wirkweise dieser HDACi vermutet werden. Da in allen Zellen unabhängig vom p53-Status auch eine vermehrte p21-Genexpression durch RETRA in Kombination mit den HDACi verzeichnet wurde, liegt die Vermutung nahe, dass p73 eine größere Bedeutung als bisher angenommen in der Regulation von Zelltod und Zellzykluskontrolle zukommen könnte.

Durch die Kombination von RETRA mit dem SIRTi Tenovin-1 zeigte sich eine deutliche Abschwächung des RETRA-induzierten Zelltodes unabhängig vom p53-Status. Tenovin-1 in alleiniger Applikation hatte in allen Zelllinien keinen Effekt auf die Apoptose. Vermutlich weisen die Sirtuine in Ewing-Sarkom-Zellen eine tumorsuppressive Wirkung auf. Eine Hemmung der SIRT1 und SIRT2 durch Tenovin-1 führte schließlich zu einer Verminderung der Zytotoxizität von RETRA. Auch die in mt-p53 und Null-p53-Zellen durchgeführten Genexpressionsanalysen bestätigen diese Ergebnisse, da ebenfalls die Induktion des p21 durch die Kombinationsbehandlung von RETRA und Tenovin-1 abgeschwächt wurde. In den Wildtyp-p53-Zellen hingegen induzierte Tenovin-1 allein die p21-Expression, wahrscheinlich über die Aktivierung von p53. Anzumerken ist, dass hierbei kein verstärkter Zelltod resultierte bzw. bei der Kombination von Tenovin-1 und RETRA in den Wildtyp-p53-Zellen ein abgeschwächter Zelltod auftrat. Die Verwendung von Tenovin-1 als mögliche Therapieoption in der Behandlung des Ewing-Sarkoms erscheint unter Betrachtung dieser Ergebnisse nicht als empfehlenswert. Im Gegensatz dazu weisen die HDACi SAHA und MS-275 allein oder in Kombination mit RETRA einen deutlichen antiproliferativen Effekt auf und würden sich aufgrund dieser Experimente für eine Antitumortherapie prädestinieren.

7. Schlussfolgerungen

Erwachsene Überlebende von kindlichen Tumorerkrankungen besitzen nach einer Untersuchung von Hudson et al. 2013 deutlich mehr gesundheitliche Risiken, die teilweise auf in der Kindheit durchgeführte Therapieformen wie Strahlen- oder Chemotherapie zurückzuführen sind. In diesem Rahmen greift auch die multimodale Therapie des Ewing-Sarkoms in aggressiver Weise in den kindlichen Organismus ein und kann langfristige gesundheitliche und entwicklungsphysiologische Folgen mit sich bringen. Es ist demnach essentiell, neue schonendere Therapieformen zu entwickeln, die weniger Nebenwirkungen und Risiken aufweisen.

Diese Forschungsarbeit zeigt, dass durch die Kombination von RETRA mit den HDACi erfolgreich der Zelltod in Ewing-Sarkom-Zellen unabhängig vom p53-Status induziert werden kann. SAHA ist bereits seit 2006 in den USA zur Therapie des CTCL zugelassen und wird in oraler und intravenöser Applikation gut toleriert (Mann et al. 2007). Nach Slingerland et al. 2013 besitzt SAHA neben der breiten antineoplastischen Aktivität eine lineare Pharmakokinetik sowie eine gute orale Bioverfügbarkeit. In einer Phase-II-Studie wurde bei fortgeschrittenem NSCLC SAHA mit Carboplatin und Paclitaxel kombiniert und eine Ansprechrate von 34% und eine Verbesserung des progressionsfreien und gesamten Überlebens festgestellt (Slingerland et al. 2013). Es liegt nahe, diesen potenten Inhibitor der HDAC in die Therapieprotokolle der Behandlung des Ewing-Sarkoms einzubeziehen.

Auch die Kombination von MS-275 und RETRA führte in allen Zelllinien zu einer deutlichen dosisabhängigen Steigerung der Apoptose. MS-275 könnte somit effektiv im Rahmen der Antitumortherapie Anwendung finden. Es zeigte sich bereits in der Phase I klinischer Studien in soliden Tumoren und Lymphomen wirksam (Hausschild et al. 2008, Ryan et al. 2005). Bei bereits intensiv vorbehandelten Patienten mit rezidivierendem metastasiertem NSCLC zeigte sich unter der Kombinationstherapie von MS-275 mit Azacitidin eine mit bereits bestehenden Therapien vergleichbare Überlebenszeitverlängerung bei ansonsten guter Verträglichkeit (Slingerland et al. 2013).

Es bedarf in Zukunft einer weiteren Evaluierung der Wirkung von RETRA, da über dessen pharmakodynamische und -kinetische Eigenschaften sowie ein mögliches Nebenwirkungsprofil aktuell keine Ergebnisse vorliegen.

Erstaunlicherweise bewirkte die Kombination von RETRA mit dem SIRTi Tenovin-1 eine deutliche Abschwächung der RETRA-induzierten Zytotoxizität unabhängig von

der Funktion des p53. Dies ist im Kontext der dualen Rolle der Sirtuine in Tumorzellen zu betrachten und lässt einen möglichen tumorsuppressiven Effekt der Sirtuine vermuten. Die Untersuchung der Sirtuin-Expression in Ewing-Sarkom-Zellen wäre notwendig, um mögliche Wirkmechanismen aufklären zu können. Vermutlich spielt auch die Tumorentität eine Rolle für die beobachteten Effekte, da sich Malignomzellen in ihren pathophysiologischen und molekularen Besonderheiten deutlich unterscheiden können.

Insgesamt bestätigen die durchgeführten Experimente die bereits in der Arbeitsgruppe um Professor Beck beobachteten antiproliferativen Effekte der HDACi in Ewing-Sarkom-Zellen (Sonnemann et al. 2007, Sonnemann et al. 2013). Die Kombination von RETRA mit den HDACi SAHA bzw. MS-275 ergibt somit neue Erkenntnisse in der Erforschung der Therapie kindlicher Malignome. Die gemeinsame Applikation von Tenovin-1 und RETRA erscheint im Rahmen der Ewing-Sarkom-Therapie dagegen kontraindiziert. Zur Klärung dieses Phänomens bedarf es aber es einer intensivierten Erforschung der Funktion und Wirkweise von Sirtuinen.

8. Literaturverzeichnis

- Ahrens S, Hoffmann C, Jabar S, Braun-Munzinger G, Paulussen M, Dunst J, Rube C, Winkelmann W, Heinecke A, Göbel U, Winkler K, Harms D, Treuner J, Jürgens H. 1999. Evaluation of prognostic factors in a tumor volume-adapted treatment strategy for localized Ewing sarcoma of bone: the CESS 86 experience. *Cooperative Ewing Sarcoma Study. Med Pediatr Oncol*, 32(3):186-95.
- Arrowsmith CH. 1999. Structure and function in the p53 family. *Cell Death Differ*, 6(12):1169-73.
- Ashkenazi A. 2002. Targeting death and decoy receptors of the tumour-necrosis factor superfamily. *Nat.Rev.Cancer*, 2(6):420-430.
- Balamuth NJ, Womer RB. 2010. Ewing's sarcoma. *Lancet Oncol*, 11(2):184–92.
- Bernstein BE, Meissner A, Lander ES. 2007. The mammalian epigenome. *Cell*, 128(4):669-81.
- Bernstein M, Kovar H, Paulussen M, Randall RL, Schuck A, Teot LA, Juergens H. 2006. Ewing's sarcoma family of tumors: current management. *Oncologist*, 11(5):503-19.
- Bolden JE, Peart MJ, Johnstone RW. 2006. Anticancer activities of histone deacetylase inhibitors. *Nat Rev Drug Discov*, 5(9):769-84.
- Bosch-Presegué L, Vaquero A. 2011. The dual role of sirtuins in cancer. *Genes Cancer*, 2(6):648-62.
- Burgert EO Jr, Nesbit ME, Garnsey LA, Gehan EA, Herrmann J, Vietti TJ, Cangir A, Tefft M, Evans R, Thomas P, et al. 1990. Multimodal therapy for the management of nonpelvic, localized Ewing's sarcoma of bone: intergroup study IESS-II. *J Clin Oncol*, 8(9):1514-24. cells.
- Cho SG, Choi EJ. 2002. Apoptotic signaling pathways: caspases and stress-activated protein kinases. *J Biochem Mol Biol*, 35(1):24-7.
- Drummond DC, Noble CO, Kirpotin DB, Guo Z, Scott GK, Benz CC. 2005. Clinical development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents. *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol*, 45, 495-528.
- Condorelli F, Gnemmi I, Vallario A, Genazzani AA, Canonico PL. 2008. Inhibitors of histone deacetylase (HDAC) restore the p53 pathway in neuroblastoma cells. *Br J Pharmacol*, 153(4):657-68.
- Cory S, Adams JM. 2002. The Bcl2 family: regulators of the cellular life-or-death switch. *Nat.Rev.Cancer*, 2(9):647-656.
- Cotterill SJ, Ahrens S, Paulussen M, Jürgens HF, Voûte PA, Gardner H, Craft AW. 2000. Prognostic factors in Ewing's tumor of bone: Analysis of 975 patients from the

European Intergroup Cooperative Ewing's Sarcoma Study Group. *J Clin Oncol*, 18(17):3108-3114.

Dai JM, Wang ZY, Sun DC, Lin RX, Wang SQ. 2007. SIRT1 interacts with p73 and suppresses p73-dependent transcriptional activity. *J Cell Physiol*, 210(1):161-6.

Davison TS, Vagner C, Kaghad M, Ayed A, Caput D, Arrowsmith CH. 1999. p73 and p63 are homotetramers capable of weak heterotypic interactions with each other but not with p53. *J Biol Chem*, 274(26):18709-14.

de Alava E, Antonescu CR, Panizo A, Leung D, Meyers PA, Huvos AG, Pardo-Mindán FJ, Healey JH, Ladanyi M. 2000. Prognostic impact of P53 status in Ewing sarcoma. *Cancer*, 89(4):783-92.

de Alava E, Gerald WL. 2000. Molecular biology of the Ewing's sarcoma/ primitive neuroectodermal tumor family. *J Clin Oncol*, 18(1):204-13.

de Ruijter AJ, van Gennip AH, Caron HN, Kemp S, van Kuilenburg AB. 2003. Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family. *Biochem J*, 370(Pt 3):737-49.

Delattre O, Zucman J, Melot T, Garau XS, Zucker JM, Lenoir GM, Ambros PF, Sheer D, Turc-Carel C, Triche TJ, et al. 1994. The Ewing family of tumors—a subgroup of small-round-cell tumors defined by specific chimeric transcripts. *N Engl J Med*, 331(5):294-9.

Deng CX. 2009. SIRT1, is it a tumor promoter or tumor suppressor? *Int J Biol Sci*, 5(2):147-52.

Drummond DC, Noble CO, Kirpotin DB, Guo Z, Scott GK, Benz CC. 2005. Clinical development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents. *Annu Rev Pharmacol Toxicol*, 45:495-528.

Duvic M, Vu J. 2007. Vorinostat: a new oral histone deacetylase inhibitor approved for cutaneous T-cell lymphoma. *Expert Opin Investig Drugs*, 16(7):1111-20.

Enari M, Sakahira H, Yokoyama H, Okawa K, Iwamatsu A, Nagata S. 1998. A caspase-activated DNase that degrades DNA during apoptosis, and its inhibitor ICAD. *Nature*, 391(6662):43-50.

Esteller M, Herman JG. 2002. Cancer as an epigenetic disease: DNA methylation and chromatin alterations in human tumours. *J Pathol*, 196(1):1-7.

Esteller M. 2008. Epigenetics in cancer. *N Engl J Med*, 358(11):1148-59.

Fadeel B, Orrenius S. 2005. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in human disease. *J Intern Med*, 258(6):479-517.

Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J. 2005. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin (Shanghai)*, 37(11):719-27.

Ferrari S, Sundby Hall K, Luksch R, Tienghi A, Wiebe T, Fagioli F, Alvegard TA, Brach Del Prever A, Tamburini A, Alberghini M, Gandola L, Mercuri M, Capanna R, Mapelli S, Prete A, Carli M, Picci P, Barbieri E, Bacci G, Smeland S. 2011. Nonmetastatic Ewing family tumors: high-dose chemotherapy with stem cell rescue in poor responder patients. Results of the Italian Sarcoma Group/ Scandinavian Sarcoma Group III protocol. *Ann Oncol*, 22(5):1221-7.

Gaiddon C, Lokshin M, Ahn J, Zhang T, Prives C. 2001. A subset of tumor-derived mutant forms of p53 down-regulate p63 and p73 through a direct interaction with the p53 core domain. *Mol Cell Biol*, 21(5):1874-87.

Gartel AL, Radhakrishnan SK. 2005. Lost in transcription: p21 repression, mechanisms, and consequences. *Cancer Res*, 65(10):3980-5.

Genuardi M, Tsihira H, Anderson DE, Saunders GF. 1989. Distal deletion of chromosome 1p in ductal carcinoma of the breast. *Am J Hum Genet*, 45(1):73-82.

Gerth HU, Juergens KU, Dirksen U, Gerss J, Schober O, Franzius C. 2007. Significant benefit of multimodal imaging: PET/CT compared with PET alone in staging and follow-up of patients with Ewing tumors. *J Nucl Med*, 48(12):1932-9.

Green DR. 2011. The end and after: how dying cells impact the living organism. *Immunity*, 35(4):441-4.

Grier HE. 1997. The Ewing family of tumors. Ewing's sarcoma and primitive neuroectodermal tumors. *Pediatr Clin North Am*, 44(4):991-1004.

Haeusler J, Ranft A, Boelling T, Gosheger G, Braun-Munzinger G, Vieth V, Burdach S, van den Berg H, Juergens H, Dirksen U. 2010. The value of local treatment in patients with primary, disseminated multifocal Ewing sarcoma (PDMES). *Cancer*, 116(2):443-50.

Hahm KB, Cho K, Lee C, Im YH, Chang J, Choi SG, Sorensen PH, Thiele CJ, Kim SJ. 1999. Repression of the gene encoding the TGF-beta type II receptor is a major target of the EWS-FLI1 oncoprotein. *Nat Genet*, 23(2):222-7.

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

Hauschild A, Trefzer U, Garbe C, Kaehler KC, Ugurel S, Kiecker F, Eigentler T, Krissel H, Schott A, Schadendorf D. 2008. Multicenter phase II trial of the histone deacetylase inhibitor pyridylmethyl-N-{4-[(2-aminophenyl)-carbamoyl]-benzyl}-carbamate in pretreated metastatic melanoma. *Melanoma Res*, 18(4):274-8.

Hengartner M.O. 2000. The biochemistry of apoptosis. *Nature*, 407(6805):770-776.

Hogendoorn PC, ESMO/EUROBONET Working Group, Athanasou N, Bielack S, De Alava E, Dei Tos AP, Ferrari S, Gelderblom H, Grimer R, Hall KS, Hassan B, Hogendoorn PC, Jurgens H, Paulussen M, Rozeman L, Taminiau AH, Whelan J, Vanel D. 2010. Bone sarcomas: ESMO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 21 Suppl 5:v204-13.

Holliday R. 1987. The inheritance of epigenetic defects. *Science*, 238(4824):163-70.

Hollstein M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. 1991. p53 mutations in human cancers. *Science*, 253(5015):49-53.

Hudson MM, Ness KK, Gurney JG, Mulrooney DA, Chemaitilly W, Krull KR, Green DM, Armstrong GT, Nottage KA, Jones KE, Sklar CA, Srivastava DK, Robison LL. 2013. Clinical ascertainment of health outcomes among adults treated for childhood cancer. *JAMA*, 309(22):2371-81.

Irwin MS, Kondo K, Marin MC, Cheng LS, Hahn WC, Kaelin WG Jr. 2003. Chemosensitivity linked to p73 function. *Cancer Cell*, 3(4):403-10.

Jaboin J, Wild J, Hamidi H, Khanna C, Kim CJ, Robey R, Bates SE, Thiele CJ. 2002. MS-27-275, an inhibitor of histone deacetylase, has marked in vitro and in vivo antitumor activity against pediatric solid tumors. *Cancer Res*, 62(21):6108-15.

Jóna A, Khaskhely N, Buglio D, Shafer JA, Derenzini E, Bollard CM, Medeiros LJ, Illés A, Ji Y, Younes A. 2011. The histone deacetylase inhibitor entinostat (SNDX-275) induces apoptosis in Hodgkin lymphoma cells and synergizes with Bcl-2 family inhibitors. *Exp Hematol*, 39(10):1007-1017.e1.

Juergens C, Weston C, Lewis I, Whelan J, Paulussen M, Oberlin O, Michon J, Zoubek A, Juergens H, Craft A. 2006. Safety assessment of intensive induction with vincristine, ifosfamide, doxorubicin, and etoposide (VIDE) in the treatment of Ewing tumors in the EURO-E.W.I.N.G. 99 clinical trial. *Pediatr Blood Cancer*, 47(1):22-9.

Kaghad M, Bonnet H, Yang A, Creancier L, Biscan JC, Valent A, Minty A, Chalon P, Lelias JM, Dumont X, Ferrara P, McKeon F, Caput D. 1997. Monoallelically expressed gene related to p53 at 1p36, a region frequently deleted in neuroblastoma and other human cancers. *Cell*, 90(4):809-19.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. 1972. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*, 26(4):239-57.

Kim J, Klionsky DJ. 2000. Autophagy, cytoplasm-to-vacuole targeting pathway, and pexophagy in yeast and mammalian cells. *Annu Rev Biochem*, 69:303-42.

Krausch G, Hrsg. 2011. Jahresbericht Deutsches Kinderkrebsregister. Mainz: Institut für Medizinische Biometrie, Epidemiologie und Informatik (IMBEI) der Johannes Gutenberg-Universität.

Kravchenko JE, Ilyinskaya GV, Komarov PG, Agapova LS, Kochetkov DV, Strom E, Frolova EI, Kovriga I, Gudkov AV, Feinstein E, Chumakov PM. 2008. Small-molecule RETRA suppresses mutant p53-bearing cancer cells through a p73-dependent salvage pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 105(17):6302-7.

Lain S, Hollick JJ, Campbell J, Staples OD, Higgins M, Aoubala M, McCarthy A, Appleyard V, Murray KE, Baker L, Thompson A, Mathers J, Holland SJ, Stark MJ, Pass G, Woods J, Lane DP, Westwood NJ. 2008. Discovery, in vivo activity, and mechanism of action of a small-molecule p53 activator. *Cancer Cell*, 13(5):454-63.

Lane DP, Cheek CF, Lain S. 2010. p53-based cancer therapy. *Cold Spring Harb Perspect Biol*, 2(9):a001222.

Levrero M, De Laurenzi V, Costanzo A, Gong J, Wang JY, Melino G. 2000. The p53/p63/p73 family of transcription factors: overlapping and distinct functions. *J Cell Sci*, 113 (Pt 10):1661-70.

Lim JH, Lee YM, Chun YS, Chen J, Kim JE, Park JW. 2010. Sirtuin 1 modulates cellular responses to hypoxia by deacetylating hypoxia-inducible factor 1alpha. *Mol Cell*, 38(6):864-78.

Liu G, Parant JM, Lang G, Chau P, Chavez-Reyes A, El-Naggar AK, Multani A, Chang S, Lozano G. 2004. Chromosome stability, in the absence of apoptosis, is critical for suppression of tumorigenesis in Trp53 mutant mice. *Nat Genet*, 36(1):63-8.

Ludwig JA. 2008. Ewing sarcoma: historical perspectives, current state-of-the-art, and opportunities for targeted therapy in the future. *Curr Opin Oncol*, 20(4):412-8.

Lunghi P, Costanzo A, Mazzerà L, Rizzoli V, Levrero M, Bonati A. 2009. The p53 family protein p73 provides new insights into cancer chemosensitivity and targeting. *Clin Cancer Res*, 15(21):6495-502.

Mann BS, Johnson JR, Cohen MH, Justice R, Pazdur R. 2007. FDA approval summary: vorinostat for treatment of advanced primary cutaneous T-cell lymphoma. *Oncologist*, 12(10):1247-52.

Marks P, Rifkind RA, Richon VM, Breslow R, Miller T, Kelly WK. 2001. Histone deacetylases and cancer: causes and therapies. *Nat Rev Cancer*, 1(3):194-202.

May WA, Lessnick SL, Braun BS, Klemsz M, Lewis BC, Lunsford LB, Hromas R, Denny CT. 1993. The Ewing's sarcoma EWS/FLI-1 fusion gene encodes a more potent transcriptional activator and is a more powerful transforming gene than FLI-1. *Mol Cell Biol*, 13(12):7393-8.

Meier P, Vousden KH. 2007. Lucifer's labyrinth-ten years of path finding in cell death. *Mol Cell*, 28(5):746-754.

Meyer JS, Nadel HR, Marina N, Womer RB, Brown KL, Eary JF, Gorlick R, Grier HE, Randall RL, Lawlor ER, Lessnick SL, Schomberg PJ, Kailo MD. 2008. Imaging guidelines for children with Ewing sarcoma and osteosarcoma: a report from the Children's Oncology Group Bone Tumor Committee. *Pediatr Blood Cancer*, 51(2):163-70.

Michan S, Sinclair D. 2007. Sirtuins in mammals: insights into their biological function. *Biochem J*, 404(1):1-13.

Michishita E, Park JY, Burneskis JM, Barrett JC, Horikawa I. 2005. Evolutionarily conserved and nonconserved cellular localizations and functions of human SIRT proteins. *Mol Biol Cell*, 16(10):4623-35.

Minucci S and Pelicci PG. 2006. Histone deacetylase inhibitors and the promise of epigenetic (and more) treatments for cancer. *Nat. Rev. Cancer*, 6(1):38-51.

Morris BJ. 2013. Seven sirtuins for seven deadly diseases of aging. *Free Radic Biol Med*, 56:133-71.

Neilsen PM, Pishas KI, Callen DF, Thomas DM. 2011. Targeting the p53 Pathway in Ewing Sarcoma. *Sarcoma*, 2011:746939.

Nicholson DW, Ali A, Thornberry NA, Vaillancourt JP, Ding CK, Gallant M, Gareau Y, Griffin PR, Labelle M, Lazebnik YA, et al. 1995. Identification and inhibition of the ICE/CED-3 protease necessary for mammalian apoptosis. *Nature*, 376(6535):37-43.

Nicoletti I, Migliorati G, Pagliacci MC, Grignani F, Riccardi C. 1991. A rapid and simple method for measuring thymocyte apoptosis by propidium iodide staining and flow cytometry. *J Immunol Methods*, 139(2):271-9.

Okada H, Mak T.W. 2004. Pathways of apoptotic and non-apoptotic death in tumour. *Nat.Rev.Cancer*, 4(8):592-603.

Palani CD, Beck JF, Sonnemann J. 2012. Histone deacetylase inhibitors enhance the anticancer activity of nutlin-3 and induce p53 hyperacetylation and downregulation of MDM2 and MDM4 gene expression. *Invest New Drugs*, 30(1):25-36.

Parkin DM, Stiller CA, Nectoux J. 1993. International variations in the incidence of childhood bone tumours. *Int J Cancer*, 53(3):371-6.

Paulino AC, Mai WY, Teh BS. 2012. Radiotherapy in Metastatic Ewing Sarcoma. *Am J Clin Oncol*, 36(3):283-6

Paulino AC, Nguyen TX, Mai WY. 2007. An analysis of primary site control and late effects according to local control modality in non-metastatic Ewing sarcoma. *Pediatr Blood Cancer*, 48(4):423-9.

Paulussen M, Bielack S, Jürgens H, Casali PG; ESMO Guidelines Working Group. 2009. Ewing's sarcoma of the bone: ESMO clinical recommendations for diagnosis, treatment and follow-up. *Ann Oncol*, 20 Suppl 4:140-2.

Payne SR, Kemp CJ. 2005. Tumor suppressor genetics. *Carcinogenesis*, 26(12):2031-45.

Rodríguez-Paredes M, Esteller M. 2011. Cancer epigenetics reaches mainstream oncology. *Nat Med*, 17(3):330-9.

Rottenberg H, Wu S. 1998. Quantitative assay by flow cytometry of the mitochondrial membrane potential in intact cells. *Biochim Biophys Acta*, 1404(3):393-404.

Rueda BR, Wegner JA, Marion SL, Wahlen DD, Hoyer PB. 1995. Internucleosomal DNA fragmentation in ovine luteal tissue associated with luteolysis: in vivo and in vitro analyses. *Biol Reprod*, 52(2):305-12.

Ryan QC, Headlee D, Acharya M, Sparreboom A, Trepel JB, Ye J, Figg WD, Hwang K, Chung EJ, Murgo A, Melillo G, Elsayed Y, Monga M, Kalnitskiy M, Zwiebel J, Sausville EA. 2005. Phase I and pharmacokinetic study of MS-275, a histone deacetylase inhibitor, in patients with advanced and refractory solid tumors or lymphoma. *J Clin Oncol*, 23(17):3912-22.

Sandberg AA, Bridge JA. 2000. Updates on cytogenetics and molecular genetics of bone and soft tissue tumors: Ewing sarcoma and peripheral primitive neuroectodermal tumors. *Cancer Genet Cytogenet*, 123(1):1-26.

Schafer KA. 1998. The Cell Cycle: A Review. *Vet Pathol*, 35(6):461-478.

Schovanec J, Mráček J, Havlas V, Trc T. 2004. Ewing's sarcoma in children—current surgical treatment options, evaluation of our patients. *Acta Chir Orthop Traumatol Cech*, 71(4):220-7.

Schuck A, Ahrens S, Paulussen M, Kuhlen M, Könemann S, Rube C, Winkelmann W, Kotz R, Dunst J, Willich N, Jürgens H. 2003. Local therapy in localized Ewing tumors: results of 1058 patients treated in the CESS 81, CESS 86, and EICESS 92 trials. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*, 55(1):168-77.

Sebastián C, Satterstrom FK, Haigis MC, Mostoslavsky R. 2012. From sirtuin biology to human diseases: an update. *J Biol Chem*, 287(51):42444-52.

Slingerland M, Guchelaar HJ, Gelderblom H. 2013. Histone deacetylase inhibitors: an overview of the clinical studies in solid tumors. *Anticancer Drugs*, 25(2):140-9

Sluga M, Windhager R, Lang S, Heinzl H, Krepler P, Mittermayer F, Dominkus M, Zoubek A, Kotz R. 2001. The role of surgery and resection margins in the treatment of Ewing's sarcoma. *Clin Orthop Relat Res*, (392):394-9.

Sonnemann J, Dreyer L, Hartwig M, Palani CD, Hong le TT, Klier U, Bröker B, Völker U, Beck JF. 2007. Histone deacetylase inhibitors induce cell death and enhance the apoptosis-inducing activity of TRAIL in Ewing's sarcoma cells. *J Cancer Res Clin Oncol*, 133(11):847-58.

Sonnemann J, Kumar KS, Heesch S, Müller C, Hartwig C, Maass M, Bader P, Beck JF. 2006. Histone deacetylase inhibitors induce cell death and enhance the susceptibility to ionizing radiation, etoposide, and TRAIL in medulloblastoma cells. *Int J Oncol*, 28(3):755-66.

Sonnemann J, Marx C, Becker S, Wittig S, Palani CD, Krämer OH, Beck JF. 2013. p53-dependent and p53-independent anticancer effects of different histone deacetylase inhibitors. *Br J Cancer* [Epub ahead of print].

Sonnemann J, Palani CD, Wittig S, Becker S, Eichhorn F, Voigt A, Beck JF. 2011. Anticancer effects of the p53 activator nutlin-3 in Ewing's sarcoma cells. *Eur J Cancer*, 47(9):1432-41.

- Steliarova-Foucher E, Stiller C, Lacour B, Kaatsch P. 2005. International Classification of Childhood Cancer, third edition. *Cancer*, 103(7):1457-67.
- Sullivan A, Lu X. 2007. ASPP: a new family of oncogenes and tumour suppressor genes. *Br J Cancer*, 96(2):196-200.
- Telford WG, King LE, Fraker PJ. 1992. Comparative evaluation of several DNA binding dyes in the detection of apoptosis-associated chromatin degradation by flow cytometry. *Cytometry*, 13(2):137-43.
- Turc-Carel C, Aurias A, Mugneret F, Lizard S, Sidaner I, Volk C, Thiery JP, Olschwang S, Philip I, Berger MP, et al. 1988. Chromosomes in Ewing's sarcoma I. An evaluation of 85 cases of remarkable consistency of t(11;22)(q24;q12). *Cancer Genet Cytogenet*, 32(2):229-38.
- Umansky SR. 1982. The genetic program of cell death. Hypothesis and some applications: transformation, carcinogenesis, ageing. *J Theor Biol*, 97(4):591-602.
- Vermes I, Haanen C, Reutelingsperger C. 2000. Flow cytometry of apoptotic cell death. *J Immunol Methods*, 243(1-2):167-90.
- Villar-Garea A, Esteller M. 2004. Histone deacetylase inhibitors: understanding a new wave of anticancer agents. *Int J Cancer*, 112(2):171-8.
- Vogelstein B, Kinzler KW. 1993. The multistep nature of cancer. *Trends Genet*, 9(4):138-41.
- Vogelstein B, Kinzler KW. 2004. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med*, 10(8):789-99.
- Vousden KH, Prives C. 2009. Blinded by the Light: The Growing Complexity of p53. *Cell*, 137(3):413-31.
- Walker PR, Weaver VM, Lach B, LeBlanc J, Sikorska M. 1994. Endonuclease activities associated with high molecular weight and internucleosomal DNA fragmentation in apoptosis. *Exp Cell Res*, 213(1):100-6.
- Xu WS, Parmigiani RB, Marks PA. 2007. Histone deacetylase inhibitors: molecular mechanisms of action. *Oncogene*, 26(37):5541-52.
- Yang A, Kaghad M, Caput D, McKeon F. 2002. On the shoulders of giants: p63, p73 and the rise of p53. *Trends Genet*, 18(2):90-5.
- Yi J, Luo J. 2010. SIRT1 and p53, effect on cancer, senescence and beyond. *Biochim Biophys Acta*, 1804(8):1684-9.
- Yuan H, Su L, Chen WY. 2013. The emerging and diverse roles of sirtuins in cancer: a clinical perspective. *Onco Targets Ther*, 6:1399-1416.
- Zhu J, Jiang J, Zhou W, Chen X. 1998. The potential tumor suppressor p73 differentially regulates cellular p53 target genes. *Cancer Res*, 58(22):5061-5.

Zong WX, Thompson CB. 2006. Necrotic death as a cell fate. *Genes Dev*, 20(1):1-15.

9. Anhang

Danksagung

An dieser Stelle möchte ich die Gelegenheit nutzen und einigen Personen meinen Dank aussprechen. Herrn Prof. Dr. Beck möchte ich für die freundliche Betreuung sowie die hilfreichen Diskussionen und Ratschläge in den allwöchentlichen Besprechungen danken.

Weiterer Dank gebührt auch Dr. Sonnemann für den Themenvorschlag, die Tipps während der Labortätigkeit sowie der wertvollen Diskussionen und nicht zuletzt das Korrekturlesen dieser Arbeit.

Herzlich bedanken möchte ich mich bei Susann Wittig und Sabine Becker für die Hilfe bei der praktischen Durchführung der Versuche, die hilfreichen Tipps, die persönlichen Gespräche und das gute Arbeitsklima.

Tiefen Dank möchte ich meiner Familie und besonders meinen Eltern aussprechen, die mich über die lange Zeit meines Studiums und auch während der Forschungszeit bedingungslos unterstützt, motiviert und mir Mut zum Durchhalten gemacht haben.

Ebensolcher Dank gehört meinen Freunden und Mitbewohnern, die stets ein offenes Ohr für meine Probleme und Launen hatten und ohne deren aufmunternden Worte ich wahrscheinlich verzweifelt wäre.

Ehrenwörtliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass mir die Promotionsordnung der Medizinischen Fakultät der Friedrich-Schiller-Universität bekannt ist,

ich die Dissertation selbst angefertigt habe und alle von mir benutzten Hilfsmittel, persönlichen Mitteilungen und Quellen in meiner Arbeit angegeben sind,

mich folgende Personen bei der Auswahl und Auswertung des Materials sowie bei der Herstellung des Manuskripts unterstützt haben: Prof. Dr. James Beck, Dr. Jürgen Sonnemann, Susann Wittig, Sabine Becker,

die Hilfe eines Promotionsberaters nicht in Anspruch genommen wurde und dass Dritte weder unmittelbar noch mittelbar geldwerte Leistungen von mir für Arbeiten erhalten haben, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen,

dass ich die Dissertation noch nicht als Prüfungsarbeit für eine staatliche oder andere wissenschaftliche Prüfung eingereicht habe und

dass ich die gleiche, eine in wesentlichen Teilen ähnliche oder eine andere Abhandlung nicht bei einer anderen Hochschule als Dissertation eingereicht habe.

Datum

Unterschrift des Verfassers