

Institut für Immunologie und Transfusionsmedizin

Abteilung Immunologie

der Medizinischen Fakultät der Ernst-Moritz-Arndt-Universität Greifswald



**Sensibilisierung von Tumorzellen für immunologische
Effektormechanismen durch Histondeacetylase-Inhibitoren**

Inaugural - Dissertation

zur Erlangung des akademischen Grades

Doktor der Medizin

(Dr. med.)

der Medizinischen Fakultät

der Ernst-Moritz-Arndt-Universität

Greifswald

2006

vorgelegt von: André Braun

geb. am: 30. September 1978

in: Ueckermünde

Dekan: Prof. Dr. rer. nat. Heyo K. Kroemer
1. Gutachter: Prof. Dr. med. B. Bröker
2. Gutachter: Prof. Dr. med. M. Suttorp
Ort, Raum: Seminarraum, Klinik C, Hämatologie/Onkologie
Tag der Disputation: 17. September 2007

Niemand ist weiter von der Wahrheit entfernt
als derjenige, der alle Antworten weiß.

Dschuang Dsi (365 - 290 v. Chr.)

Inhaltsverzeichnis

Abkürzungsverzeichnis VI

1 Einleitung 1

1.1	Immunsystem und Tumor.....	1
1.2	Regulation der Gentranskription durch Histonacetylierung.....	3
1.2.1	Einteilung der HDAC	4
1.2.2	Einteilung der HDI	5
1.2.3	Wirkungen der HDI auf Tumoren	6
1.3	Das Medulloblastom bei Kindern.....	7
1.4	Das Prostatakarzinom	8
1.5	Ziele dieser Arbeit	9

2 Material 10

2.1	Laborgeräte.....	10
2.2	Verbrauchsmaterialien.....	10
2.3	Reagenzien	11
2.4	Kulturmedien für Tumorzelllinien	12
2.5	Kulturmedium für mononukleäre Zellen	12
2.6	Tumorzelllinien	13
2.7	Weitere Puffer und Lösungen.....	13

3 Methoden..... 14

3.1	Tumorzellkulturen	14
3.2	Gewinnung von mononukleären Zellen	14
3.3	Stimulation von mononukleären Zellen	15
3.4	Bestimmung der Lebendzellzahl	15
3.5	Methoden zur Zelltodbestimmung	16
3.5.1	Calcein-Methode	16
3.5.1.1	Experimentaufbau der Calcein-Methode.....	17
3.5.2	FACS-Methode.....	18

3.5.2.1	Experimentaufbau der FACS-Methode.....	19
3.5.3	Auswertung der Daten.....	20
4	Ergebnisse	22
4.1	Ergebnisse der FACS-Methode.....	24
4.1.1	PC3 und SAHA	25
4.1.2	PC3 und NaB.....	28
4.1.3	PC3 und MS-275	30
4.1.4	PC3 und Vincristin	32
4.1.5	DAOY und SAHA.....	34
4.1.6	DAOY und NaB	36
4.1.7	DAOY und MS-275	38
4.1.8	DAOY und Vincristin.....	40
4.1.9	Zusammenfassung der Ergebnisse.....	42
5	Diskussion	44
5.1	Effekte verschiedener HDI und Vincristin	44
5.2	Effekte der aktivierten PBMC	46
5.3	Teilweise synergistische Interaktion von HDI und aktivierten PBMC	48
5.4	Bedeutung der Ergebnisse	50
6	Zusammenfassung.....	51
7	Abbildungsverzeichnis	53
8	Literaturverzeichnis.....	55

Abkürzungsverzeichnis

APC	Antigen präsentierende Zelle
CTL	Cytotoxische T-Lymphozyt
DAF	Decay-accelerating Factor
DAOY	Medulloblastomzelllinie
FSC	Forwardscatter
GVHD	Graft-Versus-Host-Disease
HAT	Histonacetyltransferase
HDI	Histondeacetylase-Inhibitor
IL	Interleukin
INF	Interferon
LAK	Lymphokin-Aktivierten-Killer
NaB	Natriumbutyrat
NK-Zelle	Natural-Killer-Zelle
PBMC	Peripheral blood mononuclear cells
PC3	Prostatakarzinomzelllinie
PI	Propidiumjodid
PNET	Primitiver neuroektodermaler Tumor
SAHA	Suberoyl Anilide Hydroxamic Acid
SSC	Sidescatter
TGF	Transforming Growth Factor
TRAIL	Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand
TSA	Trichostatin-A

1 Einleitung

1.1 Immunsystem und Tumor

Das Immunsystem hat verschiedene Aufgaben. Die Abwehr von Bakterien, Viren und Pilzen zählt zu den wichtigsten. Ständig wird das Immunsystem oder vielmehr der menschliche Körper Antigenen ausgesetzt, die in der Folge eine Immunreaktion auslösen.

Vorraussetzung für die Auslösung einer Immunreaktion ist der Kontakt des Antigens mit einem Rezeptor des Immunsystems, wie z.B. Toll-like-Rezeptoren, B-Zell-Rezeptoren, oder den T-Zell-Rezeptoren. Der Mechanismus des Erkennens ist Vorraussetzung für die Funktion des Immunsystems. Dabei ist es nicht nur wichtig, körperfremde als fremde Antigene zu erkennen, sondern auch körpereigene „Antigene“ als eigene. [1]

Bei Immunantworten gegen Tumorzellen haben sich zwei Zelltypen als relevant herausgestellt. Erstens die CD8⁺ zytotoxischen T-Lymphozyten, die über MHC-Klasse I und dem sog. Cross-priming über professionelle *Antigen präsentierende Zellen* (APC) aktiviert werden. Als Effektor-T-Zellen können sie dann die Tumorzellen auch ohne weitere Costimulation durch lytische Proteine oder dem Fas-Liganden den Tumorzelltod einleiten. Zweitens können die *Natural-Killer Zellen* (NK-Zellen) Tumorzellen, die kein MHC-Klasse I exprimieren, über ähnliche Mechanismen wie die *zytotoxischen T-Lymphozyten* (CTL) töten. Ein weiterer Mechanismus zur Induktion der

Apoptose ist die Aktivierung durch den *Tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL). Dieser Ligand existiert membran-gebunden auf aktivierten NK-Zellen und kann auch von diesen sezerniert werden. [2-4] Sowohl T- als auch NK-Zellen können durch das Cytokin Interleukin 2 (IL-2) stimuliert werden. IL-2 bewirkt bei naiven T-Lymphozyten einmal Wachstum und eine Differenzierung zu Effektor-T-Zellen. NK-Zellen werden durch Stimulation mit IL-2 zu *Lymphokin-Aktivierten-Killern* (LAK). Dadurch erhöht sich vor allem die lytische Aktivität gegen Tumorzellen.

Voraussetzung für eine erfolgreiche Tumorabwehr ist das Erkennen von Tumorzellen. Eine Tumorzelle ist primär eine körpereigene Zelle, die sich aber durch die Expression sog. Tumorantigene auszeichnet, die vom adaptiven Immunsystem erkannt werden können. Als Tumorantigene können aberrant exprimierte körpereigene, mutierte körpereigene oder onkovirale Moleküle wirken. [5]

Tumorzellen schaffen es, über verschiedene Mechanismen der Erkennung vom Immunsystem zu entfliehen. Die MHC-Klasse I –Expression kann vermindert sein und die Tumorzellen können somit nicht von zytotoxischen T-Lymphozyten erkannt werden. Weiterhin können Tumorzellen zytotoxische T-Lymphozyten nicht induzieren, wenn sie keine Costimulatoren oder MHC-Klasse II exprimieren. Denn die Aktivierung von zytotoxischen T-Lymphozyten ist auf professionelle APC angewiesen, die über costimulatorische Faktoren verfügen, wie z.B. B7-1 (CD80) oder B7-2 (CD86). Des Weiteren können Tumoren immunsuppressive Substanzen sezernieren, wie z.B. den transformierenden Wachstumsfaktor- β (TGF- β), der die Aktivität von T-Zellen unterdrückt, oder Interleukin-10 (IL-10), welches die Reifung von dendritischen Zellen herabsetzt. Tumorzellen können nicht nur der Erkennung durch das Immunsystem entkommen, sondern auch die für die Apoptose notwendigen Proteine wie z.B. den Caspasen herunterregulieren. Dadurch können sie dem programmierten Zelltod entfliehen und sind gegen einen Angriff von Abwehrzellen immun. Wird die Expression dieser Proteine in Tumorzellen wieder angeregt, so sind diese Tumorzellen z.B. empfindlicher gegen TRAIL, welcher in diesen Apoptose auslöst. [6]

1.2 Regulation der Gentranskription durch Histonacetylierung

Das Kompaktieren der DNA in eine höhere Ordnung und dynamischer Struktur des Chromatins ist ein wichtiger Kontrollpunkt für die Genexpression durch die Regulation der Abruflbarkeit von Transkriptionsfaktoren der DNA. Das Chromatin ist aus verschiedenen sich wiederholenden Einheiten aufgebaut, die Nukleosomen genannt werden. Die DNA ist um einen Kern aus acht Histonproteinen gewickelt. (Abb. 1) Modifikationen an diesen Proteinen spielen eine große Rolle für die Regulation von Genexpression und Signalübertragungen. Phosphorylierung, Methylierung und Acetylierung beeinflussen die Architektur des Chromatins und regulieren somit die Genexpression. Das Zusammenspiel aus struktureller Regulation des Chromatins, dem Zugang zur DNA und die Genexpression stellen ein Gleichgewicht dar.

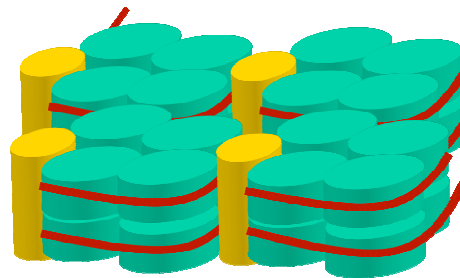


Abb. 1 Der Aufbau von Chromatin

Die DNA ist um einem Oktamer aus Histonproteinen gewunden. Ein Oktamer wird als Nukleosom bezeichnet. Die Gesamtheit aus Nukleosomen bezeichnet man als Chromatin.

Von den genannten Modifikationen an Histonproteinen ist die Acetylierung die am meisten untersuchte und studierte. Das Gleichgewicht zwischen Acetylierung und Deacetylierung wird von zwei Proteinen reguliert. Die *Histonacetyltransferase* (HAT) und die *Histondeacetylase* (HDAC) beeinflussen die Balance zwischen Acetylierung und Deacetylierung der DNA. Erhöhte Histonacetylierung ist assoziiert mit erhöhter Transkription, wohingegen erniedrigte Acetylierung mit verminderter Genexpression einhergeht. [7-9] Es ist bekannt, dass in Tumorzellen die Aktivität der HDAC sehr stark erhöht ist. Dies führt zu falscher Differenzierung, gestörter Transkription, erhöhter Überlebensdauer und unkontrollierter Proliferation. [10, 11] Die Histonacetylierung

kann durch *Histondeacetylase-Inhibitoren* (HDI) gehemmt und die Transkription dadurch aktiviert werden.

1.2.1 Einteilung der HDAC

Es gibt drei Hauptgruppen von HDAC, die auf den strukturellen Eigenschaften basieren: Klasse I (Rpd3), Klasse II (Hda1) und Klasse III (Sir2/Hst) (Abb. 2). Letztere ist NAD^+ abhängig und wird von den aktuellen HDI nicht beeinflusst. Die Klasse I und II wird von fast allen bekannten HDI inhibiert. Zur Klasse I gehören HDAC1, HDAC2, HDAC3 und HDAC8. Sie befinden sich vor allem im Zellkern und kommen in den meisten Geweben vor. Die Klasse II HDAC schließen die HDAC4, HDAC5, HDAC6, HDAC7, HDAC9 und HDAC10 ein. Diese HDAC können sich zwischen Zellkern und Zytoplasma bewegen und es ist vorstellbar, dass sie noch über weitere Aufgaben als Klasse I HDAC verfügen. [12] Insbesondere die HDAC6 ist primär im Zytoplasma zu finden. Teilweise ist beobachtet worden, dass die HDAC6 auch als Tubulindeacetylase arbeitet und so die Zellmotilität über die Regulation der Mikrotubuli beeinflusst. [13]

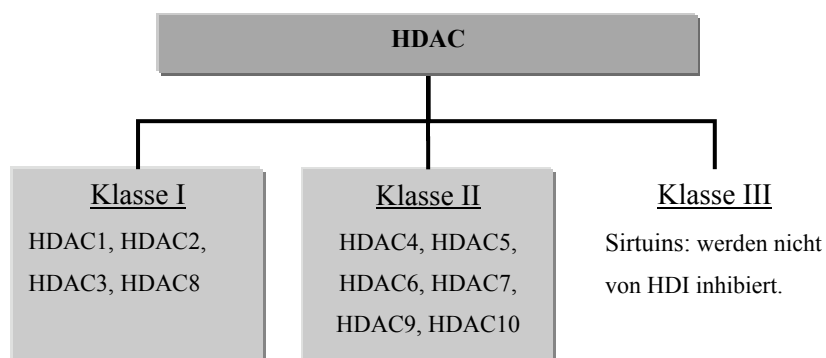


Abb. 2 Einteilung der HDAC

HDAC werden in drei Klassen unterteilt. Die Klasse I und II können von HDI inhibiert werden.

1.2.2 Einteilung der HDI

Es werden sechs strukturell unterschiedliche HDI-Gruppen unterschieden wie in Abb. 3 dargestellt. Im Folgenden werden die Gruppen vorgestellt aus denen die in dieser Arbeit verwendeten HDI stammen. HDI aus der Gruppe der Hydroxamiksäuren wie z.B. *Trichostatin-A* (TSA) oder *Suberoyl Anilide Hydroxamic Acid* (SAHA) haben drei unterschiedliche Domänen: eine hydrophobische Seite, die an der HDAC das aktive Zentrum blockiert, eine zinkbindende Seite, die mit dem aktiven Zentrum kommuniziert und einen weiteren hydrophobischen Teil, um die optimale Entfernung zwischen zinkbindender und hydrophobischer Seite herzustellen. [14]

Die HDI aus der Gruppe der Karbonsäuren mit kleinem Molekulargewicht wie z.B. *Natriumbutyrat* (NaB) oder Valproat inhibieren HDAC erst im millimolaren Bereich. Es wird angenommen, dass der Hydroxylrest mit dem Zinkion des aktiven Zentrums der HDAC kommuniziert. [15]

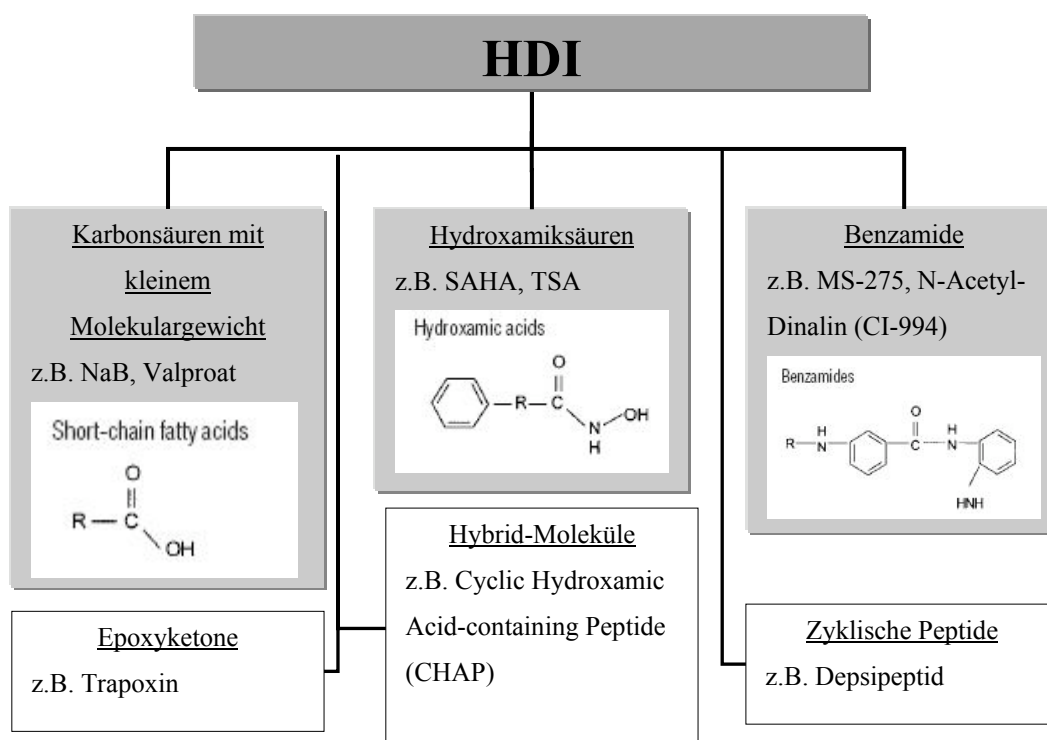


Abb. 3 Einteilung der HDI

Die HDI werden in sechs Gruppen nach ihrer Struktur eingeteilt. Die HDI der grau unterlegten Gruppen wurden in dieser Arbeit verwendet. [12]

HDI aus der Gruppe der Benzamide wie z.B. MS-275 oder CI-994 haben bisher einen unbekanntem Mechanismus der HDAC-Inhibition. Weiterhin sind sie weniger aktiv als Hydroxamate wie SAHA und liegen mit ihren Wirkkonzentrationen im millimolaren Bereich.

1.2.3 Wirkungen der HDI auf Tumoren

HDI stehen momentan im Mittelpunkt der Forschung aufgrund ihrer Wirkungen gegen maligne Erscheinungen. Insbesondere *in vitro* zeigen sie zytotoxische Effekte gegen Nierenkarzinom [16], Mammakarzinom [17, 18], Prostatakarzinom [6, 19, 20] und Neuroblastom [21-23]. Weitere Effekte konnten bei Maus-Tumor-Modellen (xenogenen Transplantaten) bei Prostata-, Pankreas- und Lungenkarzinom sowie dem Medulloblastom nachgewiesen werden. [19, 20, 23, 24]

HDI verursachen Tumorzellendifferenzierung, induzieren Apoptose und verhindern Proliferation. Durch Inhibition von HDAC ist mehr acetyliertes und transkriptionsfähiges Chromatin vorhanden. Dadurch reaktivieren sie die Genexpression von Tumorsuppressorgenen wie p21 oder p53. [25, 26] Weiterhin werden Fas/FasL, TRAIL-Rezeptor und Caspase-3 hochreguliert. [6, 17, 27, 28]

Die Effekte gegen Tumorzellen lassen sich jedoch noch nicht vollständig erklären, denn unter 2 % der Gene in malignen Zellen sind vom Einfluss der HDI betroffen. Jedoch in einer anderen Studie beeinflussten SAHA und Depsipeptid wenigstens 22% der Gene. HDI können nur eine begrenzte Anzahl an Genen modulieren. [29-31]

Eventuell spielen bei den Wirkungen der HDI gegen Tumorzellen bei *in vivo* Experimenten die zelluläre Abwehr des Immunsystems eine Rolle. Die AG Sonnemann konnte zeigen, dass mit HDI vorinkubierte Tumorzellen hochsensibel auf TRAIL mit Apoptose reagieren. Einige Tumorzelllinien waren ohne Inkubation mit HDI nahezu resistent gegenüber der Wirkung von TRAIL. [6] Da aktivierte NK-Zellen TRAIL auf ihrer Zelloberfläche haben und zusätzlich TRAIL sezernieren, könnten *in vivo* Effekte der HDI gegen Tumorzellen auf eine Wirkung der zellulären Abwehr durch NK-Zellen vermittelt werden.

Mehrere HDI haben Phase I Studien durchlaufen. Patienten mit B-Zell-Lymphomen, Hodgkin-Lymphomen, Multiplen Myelomen, T-Zell-Lymphomen, Mantelzell-Lymphomen, kleinen lymphozytischen Lymphomen und Myeloischer Leukämie wurden mit SAHA intravenös und oral behandelt. [32-35] Die Nebenwirkungen reichten von Erschöpfung, Übelkeit, Dehydratation und Myelodepression, Thrombozytopenie bei intravenöser Gabe. Ein Patient mit kleinem lymphozytischen Lymphom erreichte eine komplette Remission, ein anderer eine partielle Remission, drei andere Patienten hatten einen stabilen Krankheitsverlauf für 9 Monate. Ähnliche Ergebnisse aus Phase I Studien wurden von MS-275 und CI-994 bei soliden Lymphomen berichtet. [36, 37]

Die große Stärke der HDI liegt in der Kombination mit anderen Therapeutika. Es konnte bereits von der AG Sonnemann gezeigt werden, dass die zusätzliche Gabe von HDI es ermöglicht, bei gleicher oder höherer Effizienz die Dosis von Standardtherapien wie Chemotherapeutika oder Bestrahlung zu reduzieren. [38]. In einer Phase I Studie wurde der HDI CI-994 mit Carboplatin und Paclitaxel kombiniert und zeigte komplette und partielle Remissionen bei Patienten mit kleinzelligem Lungenkarzinom, Colonkarzinom sowie Blasenkarzinom. [37] Eine andere Studie sah bei der Kombination von Gemcitabin plus CI-994 bei Patienten mit Pankreaskarzinom keine Vorteile gegenüber alleiniger Gabe von Gemcitabin. [39]

1.3 Das Medulloblastom bei Kindern

Das Medulloblastom gehört zu den *primitiven neuroektodermalen Tumoren* (PNET). Diese repräsentieren mit 20 bis 25% die häufigsten malignen Hirntumoren im Kindesalter. Sie stellen primitive Nervenzellen dar, die als unreife Vorläuferzellen gesehen werden können. Gewöhnlich wächst das Medulloblastom vom Kleinhirnwurm in den vierten Ventrikel und kann dort durch eine Obstruktion einen Hydrozephalus verursachen. Die häufige Ausbreitung über den Rückenmarkskanal erfordert manchmal eine Therapie des gesamten Zentralnervensystems. [40] Trotz intensiver Therapie, bestehend aus Chirurgie, Bestrahlung und Chemotherapie, sterben mehr als ein Fünftel

der Kinder mit Medulloblastom. [41, 42] Die überlebenden Kinder haben häufig neurokognitive Defizite, die sich vor allem im schulischen Bereich auswirken und teilweise eine Umschulung in einen Lernförderbereich notwendig macht. [43]

1.4 Das Prostatakarzinom

Das Prostatakarzinom ist die zweithäufigste maligne Erkrankung bei Männern in Westeuropa. [44] Histologisch imponiert das Prostatakarzinom am häufigsten als Adenokarzinom. Die Häufigkeit nimmt ab dem 50. bis 60. Lebensjahr zu und erreicht im Alter von 70 Jahren ihren Gipfel. [45] Ist der Tumor nur lokal begrenzt, leben nach 10 Jahren ca. 90% der Patienten. Bei kapsulärer Invasion leben ca. 80% und bei Invasion der Samenbläschen nur noch 58% der Patienten nach zehn Jahren. [46] Die Standardtherapie des nicht metastasierten Prostatakarzinoms ist die radikale Prostatektomie, die offen oder laparoskopisch durchgeführt werden kann. Postoperative Komplikationen entstehen aufgrund der anatomischen Nähe zu bestimmten Strukturen. Bei Verletzung von Gefäßnervenbündeln kommt es zu erektiler Dysfunktion in ca. 50% der Fälle. Ein weiteres Problem ist die Inkontinenz durch Verletzung des M. sphinkter ani externus in ca. 15% der Fälle. [47] Eine alternative Strategie ist das sog. „Watchful Waiting“. Bei Patienten mit einer Lebenserwartung von weniger als zehn Jahren, sehr alten Männern und bei hoch-differenzierten Tumoren hat diese Methode die gleichen Ergebnisse wie die radikale Prostatektomie. [48, 49] Die Therapie des lokal fortgeschrittenen und metastasierten Karzinoms ist nur palliativ möglich. Goldstandard ist hier die Hormontherapie, die auf Unterdrückung von Androgenen abzielt und somit die Proliferation der androgen-abhängigen Tumoren bremst. Nach ca. einem Jahr kommt es aber durch Selektionsmechanismen zum Wachstum von androgen-unabhängigen Tumorzellen. [50]

Hormontherapie als adjuvante Therapie nach Radiotherapie hat sich als vorteilhaft gegenüber einer alleinigen Radiotherapie erwiesen. Das krankheitsfreie Intervall und die Gesamtmortalität lag bei adjuvanter Hormontherapie nach Radiotherapie bei 78% im Vergleich zu 40% in einem 66-Monats-Follow-up. [51, 52]

1.5 Ziele dieser Arbeit

HDI führen bei manchen Tumoren zu einer Hochregulation von Fas/FasL, TRAIL-Rezeptor, NKG2D-Rezeptor und agieren synergistisch mit TRAIL bei Apoptoseeinleitung bei Tumorzellen.

Durch diese Fakten sind zwei Zelltypen des Immunsystems nahezu prädestiniert für eine Unterstützung der tumortoxischen Affekte der HDI in vivo. CTL und NK-Zellen könnten mit HDI synergistisch wirken und die therapeutischen Effekte dieser Substanzen teilweise vermitteln.

Ziel dieser Arbeit ist es, Effekte zytotoxischer Immunzellen auf Tumorzellen nach deren Vorbehandlung mit HDI zu untersuchen.

Als Tumorzelllinien wurden die Prostatakarzinomzelllinie PC3 und die Medulloblastomzelllinie DAOY verwendet. Die zytotoxischen Zellen wurden aus Peripheral Blood Mononuclear Cells von Blutspendern gewonnen. Um möglichst aggressive und aktivierte CTLs gewinnen zu können, ist eine Stimulation mit IL2 notwendig. IL2 bewirkt bei aktivierten T-Lymphozyten Wachstum und Differenzierung zu Effektorzellen. Die NK-Zellen exprimieren nach IL2-Stimulation TRAIL und differenzieren LAK. [2-4, 53]

2 Material

2.1 Laborgeräte

FACS-Gerät	BD FACScan
Bürker-Zählkammer	OptikLabor, Friedrichsdorf
CO ₂ -Inkubator	Binder Labortechnik, Tuttlingen
Lichtmikroskope	Hund, Wetzlar und Carl Zeiss, Jena
Pipetten	Eppendorf, Hamburg
Sterilwerkbank	Heraeus Instruments, Hanau
Vortex (Schüttelgerät)	Heidolph, Schwabach
Zentrifuge: Megafuge 1.0/1.0R	Heraeus Instruments, Hanau

2.2 Verbrauchsmaterialien

15 ml Zentrifugenröhrchen	Sarstedt, Nürnberg
50 ml Zentrifugenröhrchen	Sarstedt, Nürnberg
Pipettenspitzen	Eppendorf, Hamburg und Greiner, Frickenhausen

Reaktionsgefäße (0,5 ml, 1,5 ml und 2,0 ml)	Eppendorf, Hamburg
Sterilfilter (0,4 µm)	Schleicher & Schuell, Dassel
Zellkulturflaschen (25-, 75-, 175 cm ²)	Nunc, Roskilde, Dänemark
Zellkulturplatten (24-, 96-Loch-, Flachboden)	Nunc, Roskilde, Dänemark

2.3 Reagenzien

Beads, 10 Mikron	Polysciences, Inc., Fluoresbrite plain YG 10.0 micron
Calcein-AM	Molecular Probes, Oregon, USA
Ethanol	J.T.Baker, Deventer, Holland
FACS-Puffer	BD FACSFLOW™
Fetales Kälberserum (FCS)	Gibco BRL, Eggenstein
Ficoll (Dichte 1,077 g/cm ³)	Biochrom AG, Berlin
Humanserum	Blutspende Transfusionsmedizin, Universität Greifswald
Improved MEM Zn ²⁺ -Option (Richter's Modification)	Invitrogen, Karlsruhe
L-Glutamin	Biochrom AG, Berlin
MEM (Dulbecco's)	Biochrom AG, Berlin
MS-275	Altana Pharma, Konstanz
Natriumbutyrat	Sigma, Deisenhofen
PBS	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
Penicillin / Streptomycin	PAA Laboratories, Pasching, Österreich
RPMI 1640	PAA Laboratories, Pasching,

	Österreich
SAHA	Alexis, Grünberg
Trypsin/EDTA, 10x	Biochrom, Berlin
Trypanblau-Lösung	Sigma, Deisenhofen
Vincristin	Sigma, Deisenhofen

2.4 Kulturmedien für Tumorzelllinien

MEM für PC3-Zellen:	500 ml MEM 10 % FCS 2 % L-Glutamin (200 mM) 2 % Penicillin/ Streptomycin
Improved MEM für DAOY-Zellen:	500 ml Improved MEM Zn ²⁺ -Option (enthält L-Glutamin, L-Prolin, Gentamicin, ohne Phenolrot) 10 % FCS 2 % Penicillin / Streptomycin

2.5 Kulturmedium für mononukleäre Zellen

R10HS:	500 ml RPMI 1640 (ohne Glutamin) 10 % Humanserum (steril filtriert) 2 % L-Glutamin (200 mM) 2 % Penicillin/ Streptomycin
R10F:	500 ml RPMI 1640 (ohne Glutamin) 10 % FCS (steril filtriert, hitzeinaktiviert)

2 % L-Glutamin (200 mM)
2 % Penicillin/ Streptomycin

2.6 Tumorzelllinien

Prostate Cancer-Zelllinie (PC3)	American Type Culture Collection, Rockville, USA
Medulloblastom-Zelllinie (DAOY)	Geschenk von Dr. M. Grotzer, Zürich

2.7 Weitere Puffer und Lösungen

Lysepuffer	0,2 % Triton
Trypanblau-Lösung:	50 ml Trypanblau-Lösung 50 ml PBS
Trypsinlösung:	10x Trypsin/EDTA 1:10 verdünnt mit sterilem PBS

3 Methoden

3.1 Tumorzellkulturen

Die zellbiologischen Arbeiten wurden unter einer Sterilwerkbank durchgeführt. Die PC3-Zellen wurden in ca. 35ml MEM-Lösung bei 37°C und 5%iger CO₂- Atmosphäre in einer 175cm²-Kulturflasche inkubiert. Die DAOY-Zellen wurden in der Improved MEM Zn²⁺-Option-Lösung kultiviert. Bei ungefähr 90%iger Konfluenz erfolgte das „Ernten“ der Zellen. Nach zweimaligem Waschen mit ca. 25ml PBS wurden die Zellen mit 3ml Trypsin-EDTA beschichtet und für 5 bis 6 Minuten inkubiert. Unter mikroskopischer Kontrolle konnte das Ablösen der Tumorzellen beobachtet werden. Nach dem Abstoppen des Vorgangs durch 50ml PBS konnten die Zellen entnommen und bei 1600U/min für 5min zentrifugiert werden. Das entstandene Zellpellet wurde in Medium aufgenommen. Ein Teil der Zellen wurde je nach Bedarf mit 35ml Medium in eine Kulturflasche gegeben und im CO₂-Inkubator gehalten.

3.2 Gewinnung von mononukleären Zellen

Aus dem Blut von Spendern der Transfusionsmedizin der Universität Greifswald wurde

ein Erythrozyten-depletiertes Zellkonzentrat hergestellt, ein sog. Buffy-Coat. Nach 1:2 Verdünnung mit PBS erfolgte die vorsichtige Aufschichtung der Suspension auf ca. 7 bis 10ml Ficoll in einem 50ml-Röhrchen. Durch Zentrifugation bei 2800U/min für 15min ohne Bremse erfolgte die Trennung von Erythrozyten und mononukleären Zellen durch Bildung eines Zellrings aus Lymphozyten und Monozyten über dem Ficoll. Die Zellen aus dem Zellring wurden abpipettiert, in PBS resuspendiert und bei 1700U/min für 5min zentrifugiert. Eventuell verbliebene Erythrozyten im Zellpellet konnten durch steriles Wasser lysiert werden. Zweimaliges Zentrifugieren bei 800U/min für 5min reduzierte die Blutplättchen im noch thrombozytenreichen Zellpellet. Man erhielt so genannte *Peripheral blood mononuclear cells* (PBMC). Nach Aufnahme des Zellpellets in 20 bis 40ml R10HS erfolgte die Zellzählung.

3.3 Stimulation von mononukleären Zellen

Interleukin-2 (IL-2) stimuliert isolierte PBMC, so dass aus NK-Zellen LAK und aus naiven T-Lymphozyten zytotoxische T-Lymphozyten entstehen. Um diese Zelltypen zu generieren, wurden in 175 cm²-Kulturflaschen in einem Volumen von 50 ml R10HS ca. $60 \cdot 10^6$ PBMC über 72 h mit einer IL-2-Konzentration von 6000 IU/ml inkubiert.

3.4 Bestimmung der Lebendzellzahl

Trypanblau wird nur von toten Zellen aufgenommen. 10µl der Zellsuspension wurden in 90µl Trypanblaulösung aufgenommen. In einer Bürker-Zählkammer erfolgte die Zellzählung der lebenden Zellen.

3.5 Methoden zur Zelltodbestimmung

Es wurden zwei Methoden zur Quantifizierung des Zelltodes verwendet. Die Calcein-Methode zur fluorometrischen Bestimmung des Zelltodes und die FACS-Methode, bei der durch PI-Markierung tote Tumorzellen definiert werden. Im Folgenden sollen beide Methoden erläutert werden.

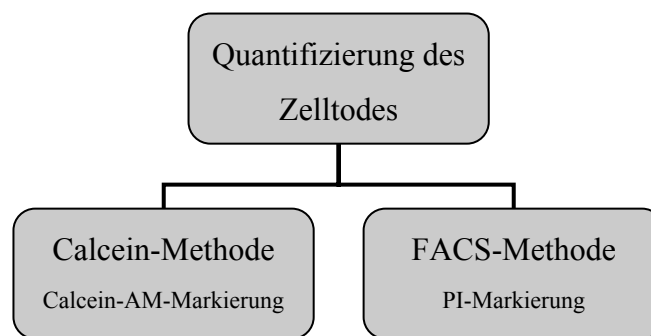


Abb. 4 Methoden zur Tumorzelltodbestimmung

3.5.1 Calcein-Methode

Die Methode beruht auf der Spaltung des durch Zellen aufgenommenen, nicht fluoreszierenden Calcein-AM-Esters durch zytoplasmatische Esterasen. Es entsteht das sehr stark fluoreszierende Calcein (Absorption 494nm, Emission 517nm, molarer Extinktionskoeffizient 76 000). Vitale Zellen halten Calcein im Zytoplasma, während es bei einer Zell-Lyse zu einer Calceinfreisetzung kommt. Die Fluoreszenz kann mit einem Plattenfluorometer (Exzitationsfilter 485/20nm, Emissionsfilter 530/25 nm) gemessen werden.

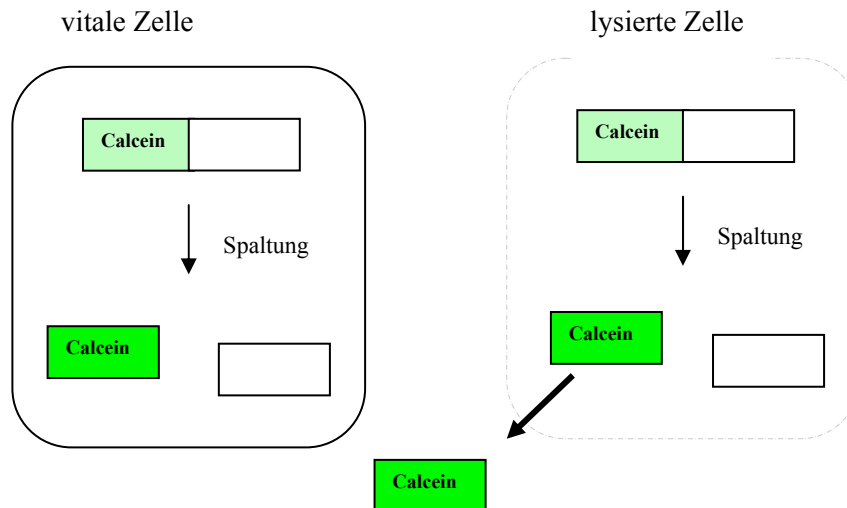


Abb. 5 Calceinspaltung

Der Calcein-AM-Ester wird durch zytoplasmatische Esterasen hydrolysiert. So entstandenes fluoreszierendes Calcein wird in vitalen Zellen zurückgehalten und bei Zell-Lyse freigesetzt. Die Fluoreszenz lässt sich im Plattenfluorometer messen.

3.5.1.1 Experimentaufbau der Calcein-Methode

Aus Spenderblut isolierte PBMC wurden drei Tage mit 500000IU/ml IL-2 stimuliert. PC3-Tumorzellen wurden in einer Konzentration von $1 \cdot 10^4$ Zellen in 100µl MEM pro Vertiefung in 96-Loch-Zellkulturplatten eingesät, wobei für die 1,5h und 3h Kinetik je eine Platte sowie eine Platte zur mikroskopischen Kontrolle benötigt wurden. Nach ca. 24h wurde dem Kulturmedium 2, 5 und 10µM SAHA in je 200µl pro Vertiefung zugesetzt. Nach 24-stündiger Inkubation wurden die Tumorzellen zweimal mit PBS gewaschen und mit 12,5µM Calcein-AM in je 50µl pro Vertiefung 30min bei 36°C inkubiert. Anschließend erfolgte ein erneutes zweimaliges Waschen mit PBS und die Zugabe der vorher bei 1200U/min für 6min zentrifugierten PBMC in unterschiedlichen Konzentrationen in 200µl R10F pro Vertiefung. Als Kontrolle wurden Tumorzellen mit Lysepuffer versetzt, um eine maximale Lyse zu erreichen. Die Zellkulturplatten wurden 30s bei 200G zentrifugiert und 1,5h bzw. 3h bei 37°C inkubiert. Nach der jeweiligen Inkubationszeit erfolgte das Abnehmen der Überstände und die Lyse der verbliebenen Zellpellets, um beim Messen eine reziproke Kontrolle zu bekommen. Danach wurde die fluorometrische Messung der Überstände und der lysierten Zellpellets nach mindestens 15min durchgeführt.

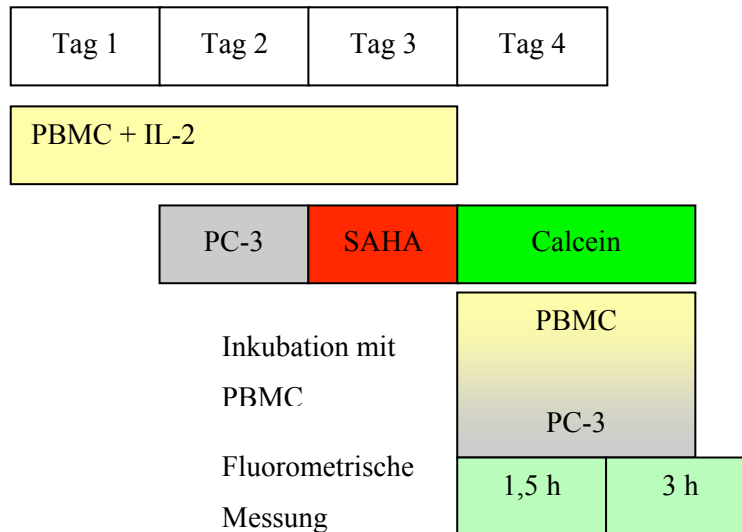


Abb. 6 Experimentaufbau der Calceinmethode

Tag 1: Gewinnung von PBMC, Tag 2: Einsäen von PC3, Tag 3: Inkubation mit SAHA, Tag 4: Calcein-Markierung, Inkubation mit PBMC, fluorometrische Messung

3.5.2 FACS-Methode

Die FACS-Methode beruht auf der Analyse der Zellpopulationen durch die Durchflusszytometrie. Einzelne Zellen werden in einem laminaren Strom einzeln an einem Laser vorbeigeführt. Durch die entstehenden Reflexionsmuster können Lichtdetektoren Größe und Granularität jeder einzelnen Zelle bestimmen. Die Größe einer Zelle wird durch den *Forwardscatter* (FSC), d. h. den „Schatten“ der Zelle im Laserlicht, ihre Granularität durch den *Sidescatter* (SSC), das seitlich abgelenkte Streulicht, bestimmt.

Zusätzlich können durch bestimmte Fluoreszenzfarbstoffe, die beispielsweise an Antikörper gebunden sind, definierte Zellpopulationen angefärbt und diese dadurch differenziert werden.

Um den Tumorzelltod mit dem Durchflusszytometer zu bestimmen, gibt es verschiedene Möglichkeiten. *Propidiumiodid* (PI) interkaliert in doppelsträngige DNA und färbt so den Zellkern. Es dringt nur durch die Plasmamembran toter Zellen, lässt sich mit Licht der Wellenlänge 490nm anregen und emittiert Licht der Wellenlänge 635nm. Das Durchflusszytometer misst die toten, rot leuchtenden Zellen in der

Fluoreszenz 2 (FL-2).

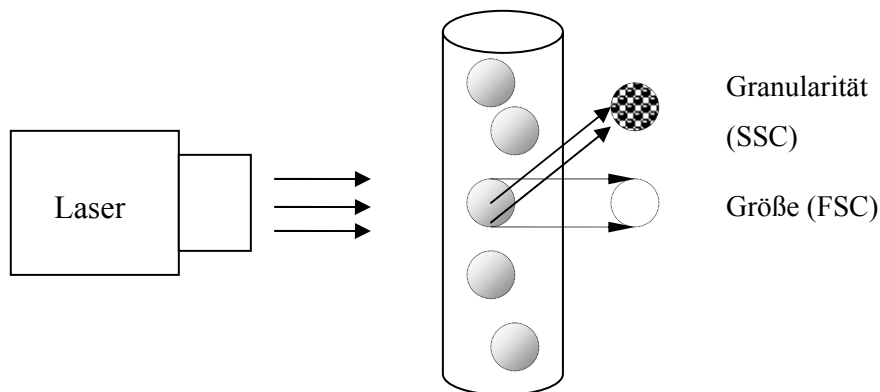


Abb. 7 Prinzip der Durchflusszytometrie:

An einem Laser vorbeigeführte Zellen können durch ihren „Schatten“ (FSC) und Streulicht (SSC) nach Größe und Granularität differenziert werden.

3.5.2.1 Experimentaufbau der FACS-Methode

Analog zur Calcein-Methode wurden aus Spenderblut PBMC gewonnen und mit IL-2 stimuliert. Am darauf folgenden Tag wurden Tumorzellen in die Vertiefungen einer 24-Vertiefung-Zellkulturplatte eingesät. Die optimale Tumorzellzahl lag bei der PC3-Linie bei $5 \cdot 10^4$ Zellen pro Vertiefung. Für die Medulloblastomzelllinie DAOY war eine Konzentration von $4 \cdot 10^4$ Zellen pro Vertiefung als optimal herausgestellt. Je Vertiefung wurde 1ml des entsprechenden Mediums verwendet. Am dritten Tag erfolgte die Inkubation der Tumorzellen mit verschiedenen Konzentrationen der HDIs. Für die Experimente wurden Konzentrationen der HDIs verwendet, die jeweils eine Tumorzellreduktion um ca. 66 % und ca. 50 % bewirkten. Für SAHA ergaben sich die Konzentrationen 1 und $5 \mu\text{M}$, für NaB 1 und 5mM. Bei MS-275 lagen diese Konzentrationen bei 2 und $10 \mu\text{M}$. Das Zytostatikum Vincristin hatte Wirkkonzentrationen von 2 und 10nM. Da die verwendeten Tumorzellen an den Boden der Zellkulturplatten adhären, konnte der Kulturüberstand abpipettiert und durch je 1ml der HDI-Lösung im entsprechenden Medium ersetzt werden. Tumorzellen ohne HDI-Inkubation dienten als Kontrolle. Am vierten Tag wurden die Überstände wieder abgenommen und durch eine Zellsuspension aus stimulierten PBMC ersetzt. Die stimulierten PBMC wurden vorher bei 1200U/min für 6min zentrifugiert und auf die

Konzentrationen $1 \cdot 10^5$ und $1 \cdot 10^6$ PBMC eingestellt. Am fünften und am sechsten Tag erfolgten die zytofluometrischen Messungen. Die Überstände mit den PBMC wurden verworfen und die Tumorzellen je einmal mit Medium und PBS gewaschen. Die danach noch adhärenen Tumorzellen wurden durch eine 6-8min Inkubation mit $200 \mu\text{l}$ Trypsin-EDTA von den Zellkulturplatten abgelöst. Danach wurde die Reaktion mit Medium abgestoppt und die Tumorzellsuspension in Zentrifugenröhrchen überführt. Es folgte eine mikroskopische Kontrolle der *Vertiefungen*, um eventuell noch adhärenente Zellen durch nochmaliges Waschen zu lösen.

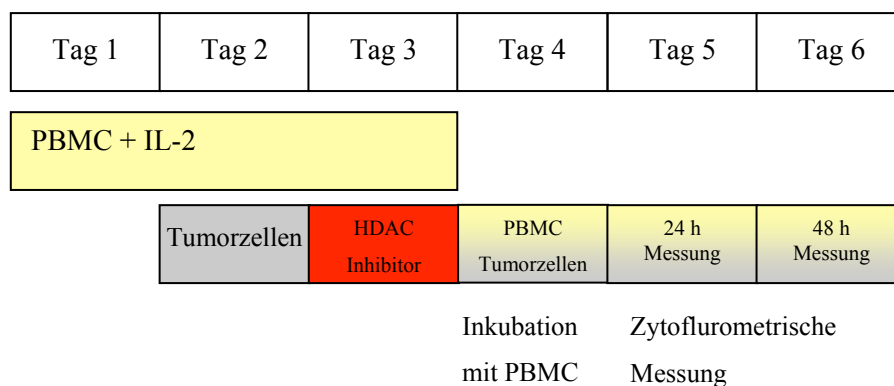


Abb. 8 Experimentaufbau der FACS-Methode:

Tag 1: Gewinnung und Stimulation von PBMC, Tag 2: Einsäen von Tumorzellen, Tag 3: Inkubation mit dem HDI, Tag 4: Inkubation mit PBMC, Tag 5: zytofluometrische Messung 24 h, Tag 6: zytofluometrische Messung 48h.

Die Zellsuspension in den 15ml *Falcon-Röhrchen* wurden bei $1200 \text{U}/\text{min}$ für 6min zentrifugiert. Die Zellpellets wurden in $200 \mu\text{l}$ des entsprechenden Medium (MEM oder improved MEM) aufgenommen und in FACS-Röhrchen überführt. Dann erfolgte das zytofluorometrische Messen der Proben.

3.5.3 Auswertung der Daten

Die Daten aus den Messungen mit dem FACS-Gerät wurden mit dem Programm

Cellquest der Firma Becton, Dickinson and Company gewonnen und mit dem Programm WinMDI von Joe Trotter (The Scripps Research Institute), der dieses Programm kostenlos zur Verfügung stellt, ausgewertet. Die Tumorzellen wurden nach Größe, Granularität und Eigenfluoreszenz definiert. Für die statistische Analyse wurde GraphPad Prism 3.02 verwendet. Als statistischer Test kam ein gepaarter, zweiseitiger T-Test zur Anwendung.

4 Ergebnisse

Zunächst wurde eine Methode gesucht, mit der sich ein möglicher Einfluss von HDI auf die Empfindlichkeit von Tumorzellen für zytolytische Effektormechanismen des Immunsystems messen lässt. Eine Schwierigkeit ist dabei, dass der Tod der Tumorzellen in Anwesenheit eines Überschusses von Immunzellen bestimmt werden muss. Zunächst wurde eine Variante des bekannten Chromfreisetzungstests geprüft, bei dem die Tumorzellen statt mit einem radioaktivem Chromisotop durch einen Fluoreszenzfarbstoff markiert werden, dem Calcein. In einem zweiten Ansatz wurde die Zahl überlebender Tumorzellen durchflusszytometrisch erfasst.

Ergebnisse der Calcein-Methode:

Bei diesem Verfahren werden die Tumorzellen mit einem Calceinester inkubiert, der von den Zellen aufgenommen wird. Dort findet eine Spaltung der Esterverbindung statt, so dass der fluoreszierende Farbstoff Calcein entsteht. Sobald bei Zelltod die Membran permeabel wird, wird das Calcein in den Kulturüberstand freigesetzt, wo seine Konzentration fluorometrisch gemessen werden kann. Im Idealfall ist sie ein Maß für den Anteil toter Zellen. Eine bekannte Schwierigkeit der Methoden, die auf der Freisetzung zytoplasmatischer Substanzen beruhen, ist deren spontane Freisetzung,

entweder durch spontane Zellyse oder durch aktiven Transport. Die spontane Freisetzung schränkt den Messbereich ein. Das Ausmaß und die Kinetik der Spontanfreisetzung sind abhängig vom Zelltyp. Messungen sind dann optimal möglich, wenn die Spontanfreisetzung innerhalb von 4 Stunden höchstens 25% der maximalen Freisetzung beträgt. Um herauszufinden, ob die Spontanfreisetzung von Calcein gering genug war, um einen Meßbereich zu erhalten, der den Einfluss von einem HDI als auch aktivierten PBMC beinhaltet, wurden mehrere Experimente durchgeführt. Die ersten Experimente zeigten, dass die spontane Calceinfreisetzung innerhalb von 1,5 Stunden bereits 50% der maximalen Calceinfreisetzung betrug. Damit war der Messbereich stark eingeschränkt. Betrachtete man die Werte für die Titration von SAHA, zeigte sich auch ein unerwarteter Effekt. Die Fluoreszenz nahm mit steigender SAHA-Konzentration ab. Wurden Immunzellen zur Kultur hinzugefügt, ließ sich keine Calceinfreisetzung mehr messen, obwohl im Mikroskop Zelltod zu beobachten war. Die Messwerte lagen unter der Medium-Kontrolle. Deshalb ließ sich ein möglicher Effekt der PBMC mit dieser Methode nicht nachweisen. Gründe könnten erstens in der zu großen eingesäten Tumorzellzahl von $4 \cdot 10^4$ Zellen pro Vertiefung liegen, da es eventuell zu einem Raummangel für die Zellen kam und dadurch zu einer erhöhten Spontanlyse, zweitens in der zu großen zytotoxischen Wirkung von SAHA, so dass weniger Tumorzellen Calcein aufnehmen konnten und drittens eventuell in der Aufnahme des Calceins durch die PBMC.

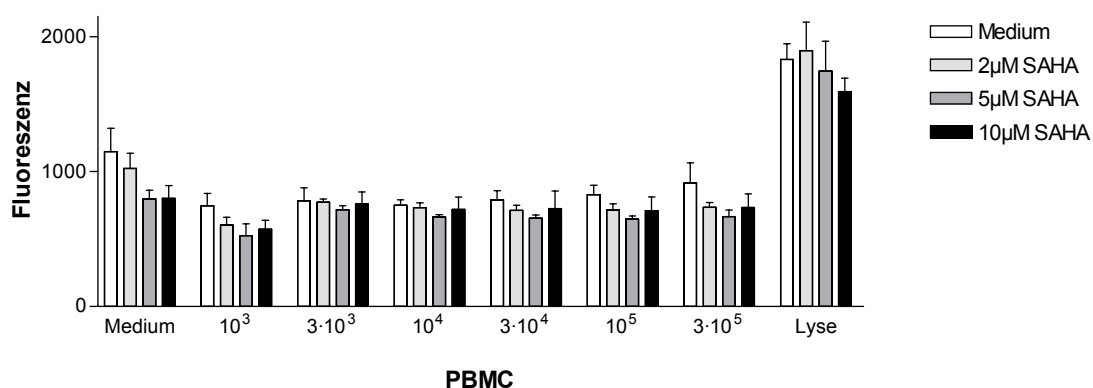


Abb. 9 Tumorzelltod in Abhängigkeit von der SAHA- und PBMC-Konzentration
 Konzentrationsreihe von 10^3 bis $3 \cdot 10^4$ PBMC mit Medium-Kontrolle auf der linken Seite und maximaler Lyse auf der rechten Seite. Titrationsreihe von SAHA von $2 \mu\text{M}$ bis $10 \mu\text{M}$. Auswertbarer Bereich lag zwischen der Medium-Kontrolle und der maximalen Zellyse. Jedoch keine der Werte erreichten diesen Bereich. Fluoreszenz nahm mit Zunahme der SAHA-Konzentration ab. Ein Effekt der PBMC war nicht zu erkennen. Der Fehlerbalken spiegelt die Standardabweichung wider.

Ein anderes Experiment sollte die optimale Tumorzellzahl je Vertiefung ermitteln. Die Freisetzung von Calcein war proportional zur eingesäten Tumorzellzahl. Die spontane Freisetzung von Calcein nach 1,5 Stunden betrug unabhängig von der eingesäten Tumorzellzahl 50%. Daraus folgt eine geringe Sensitivität der Methode. Bei weiteren Experimenten konnte auch keine eindeutige Wirkung der aktivierten PBMC mit dieser Methode nachgewiesen werden. Folglich wurde der Schwerpunkt auf die Entwicklung einer durchflusszytometrischen Methode verlagert. Die Ergebnisse dieser Methode werden im Folgenden dargestellt und erläutert.

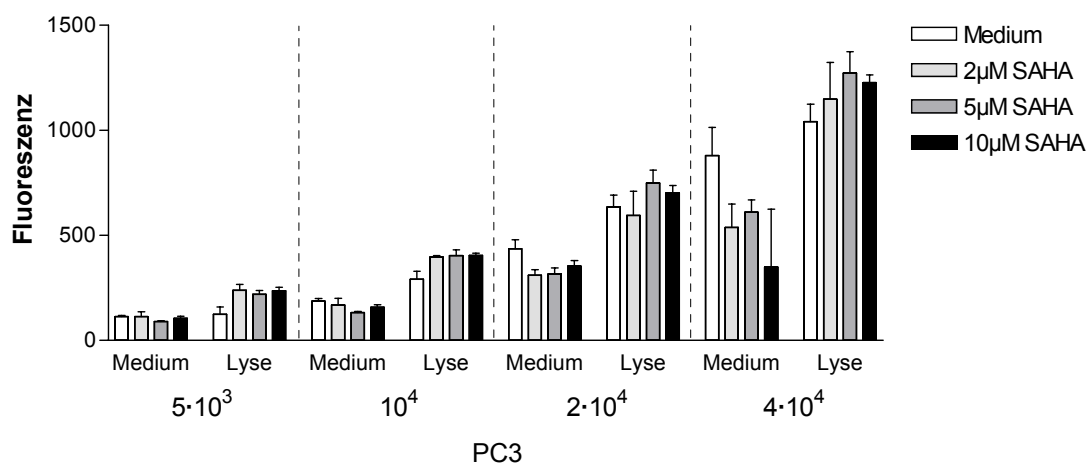


Abb. 10 Fluoreszenz in Abhängigkeit von der SAHA-Konzentration und Tumorzellzahl
Unabhängig von der verwendeten Tumorzellzahl wurde innerhalb von 1,5h etwa 50% des aufgenommenen Calceins freigesetzt. Die Effekte von SAHA auf die Tumorzellen waren insgesamt gering. Die Fehlerbalken spiegeln die Standardabweichung wider.

4.1 Ergebnisse der FACS-Methode

Tumorzellen wurden in eine 24-Vertiefung-Platte eingesät, für 24 Stunden mit einem HDI inkubiert und dann für 24 oder 48 Stunden mit aktivierten PBMC konfrontiert. Nach durchflusszytometrischer Quantifizierung der überlebenden Tumorzellen lassen sich Aussagen über deren Zahl in Abhängigkeit von der HDI- und PBMC-Konzentration treffen. Zur Bestimmung der absoluten Tumorzellzahlen im FACS wurde jeder *Vertiefung* eine definierte Anzahl von Beads zugesetzt und in Relation zu den gemessenen Anteilen der lebenden und toten Tumorzellen gebracht. Um die lebenden

von den toten Tumorzellen zu trennen, erfolgte eine PI-Färbung, die die toten Zellen markiert und in der Fluoreszenz-3 zu messen ist. Auf diese Weise ließ sich die Anzahl lebender Tumorzellen genau bestimmen. Die Daten lassen sich in einem Histogramm darstellen und auswerten.

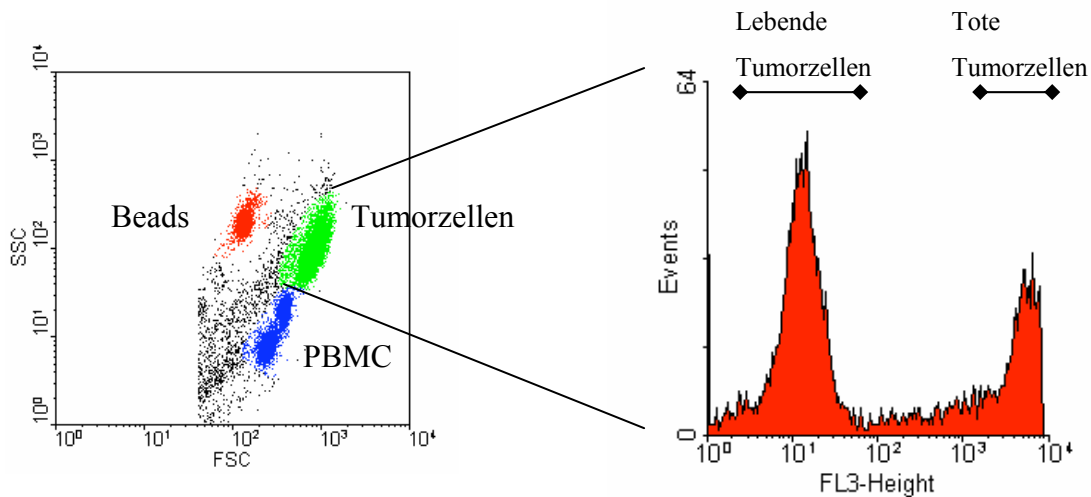


Abb. 11 Die FACS-Methode

Die Beads zur Quantifizierung der Zellrelationen stellen die rote, die Tumorzellen die grüne und die PBMC die blaue Population dar. Durch ein Gate werden nur die Tumorzellpopulation nach PI-Färbung analysiert. Dadurch kann man tote von lebenden Tumorzellen unterscheiden.

4.1.1 PC3 und SAHA

Die ersten Experimente wurden mit der PC3-Tumorzelllinie und dem HDI SAHA durchgeführt. Der Zelltod wurde nach jeweils 24 und 48 Stunden gemessen. Um die drei Experimente zusammenzufassen (bei 48 Stunden sind es vier Experimente), wurden die absoluten Werte mit der jeweiligen Zahl unbehandelter Tumorzellen normalisiert (=100%) und in Prozent ausgedrückt. Betrachtet man die Werte mit den jeweiligen PBMC-Konzentrationen, so sieht man, dass die PBMC einen Effekt auf die PC3 hatten. Bei 10⁵ PBMC reduzierte sich die Tumorzellzahl auf ca. 75% und durch Verzehnfachung der PBMC auf 10⁶ sank die Zahl der überlebenden PC3 auf ungefähr 25%. Nach 48 Stunden nahm sowohl absolut als auch relativ die Tumorzellzahl zu. So ergab sich bei 10⁵ PBMC ein Wert von 85% und bei 10⁶ PBMC ca. 30% überlebende Tumorzellen. Die Wirkung der PBMC auf die Tumorzellen erschien zeitlich begrenzt.

Eine 24-stündige Inkubation mit SAHA allein führte innerhalb von 24 bis 48 Stunden ebenfalls zum Zelltod. Der Effekt war konzentrationsabhängig. Die Inkubation mit $1\mu\text{M}$ SAHA bewirkte eine Reduktion der Tumorzellen auf 75% nach 24 Stunden. Der Effekt von $1\mu\text{M}$ SAHA war ebenfalls zeitlich begrenzt, denn nach 48 Stunden hatte sich die Tumorzellzahl sowohl absolut als auch relativ auf ca. 80% erhöht. Ursache könnte die Entnahme von SAHA aus der Kultur zu Beginn der PBMC-Inkubation sein. SAHA in einer Konzentration von $5\mu\text{M}$ bewirkte eine Reduktion der überlebenden PC3 auf 40% nach 24 Stunden. Nach 48 Stunden ergab sich eine nochmalige Reduktion um 10% auf ca. 30%. Offenbar war der Effekt einer höheren Konzentration von SAHA nachhaltiger. Wurde die Inkubation mit PBMC mit einer Vorbehandlung mit SAHA kombiniert, so ergaben sich verstärkende Effekte. Durch die Vorinkubation mit $1\mu\text{M}$ SAHA sank die prozentuale Überlebenszahl bei 10^5 PBMC von 75% auf ca. 50%. Bei 10^6 PBMC sank der Anteil überlebender Zellen nochmals um die Hälfte auf 25%. Ein noch deutlicherer Effekt ergab sich bei $5\mu\text{M}$ SAHA-Konzentration. Durch die Zugabe von 10^5 PBMC sank der Anteil auf 25% und bei 10^6 PBMC auf unter 10%. Der maximale Effekt war bei $5\mu\text{M}$ SAHA und 10^6 PBMC nach 48 Stunden zu sehen. Hier fiel die Zahl der überlebenden Zellen auf unter 5%. (Abb. 12)

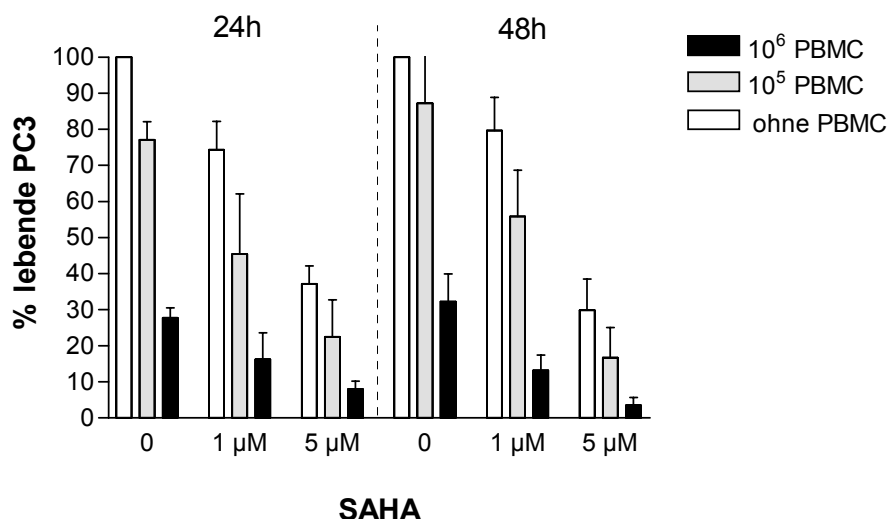


Abb. 12 Tumorzelltod in Abhängigkeit von der SAHA- und PBMC-Konzentration
Sowohl die PBMC (graue und schwarze Balken) als auch SAHA bewirkten eine Tumorzellreduktion. Durch die Kombination beider ergab sich eine deutliche Reduzierung der überlebenden Tumorzellen. Gezeigt werden die arithmetischen Mittel von drei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken spiegeln Standardabweichung wider.

Sowohl die PBMC als auch SAHA zeigten einen zytotoxischen Effekt auf die PC3-Tumorzellen. Die Frage war, ob es sich um einen additiven oder synergistischen Effekt handelt. Wenn es sich um einen additiven Effekt der PBMCs handelt, müssten die prozentualen Anteile überlebender Zellen gleich bleiben, wenn man bei verschiedenen HDI-Konzentrationen die Kontrollen ohne PBMC-Zusatz mit 1 gleich setzt.

Als über-additiven Effekt definierten wir eine Verringerung des relativen Anteils überlebender Tumorzellen auf 50% und 75% der HDI-freien Kontrolle. Bei einer Verringerung auf unter 50% sprechen wir von einem synergistischen Effekt zwischen aktivierten PBMC und dem HDI. (Abb. 13)

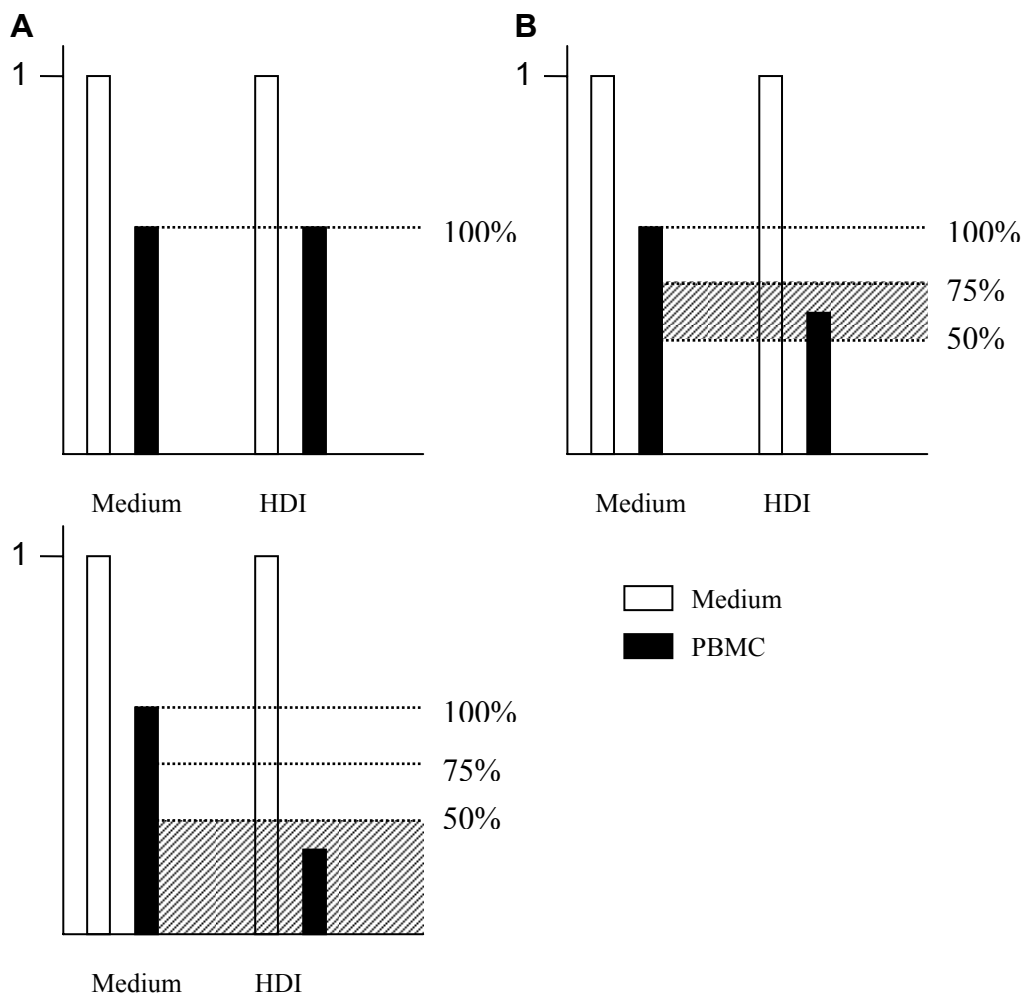


Abb. 13 Definition: Synergismus, über-additiver und additiver Effekt

Abbildung A zeigt gleich bleibende Relationen und somit einen rein additiven Effekt von aktivierten PBMC und dem HDI. Abbildung B stellt abnehmende Relationen dar, die zwischen 50% und 75% liegen und als über-additiven Effekt bezeichnet werden. Abbildung C spiegelt die Relationen bei einem Synergismus wider. Die Relationen verringern sich auf unter 50%.

In der Analyse der Wirkung von PBMC und SAHA auf PC3 wurden unterschiedliche Effekte erzielt. Wenn man die Werte „ohne PBMC“ gleich 1 setzte, ergaben sich mit zunehmender HDI-Konzentration teilweise Unterschiede in den prozentualen Anteilen der überlebenden Tumorzellen.

Die 24h-Werte zeigten bei 1 μM SAHA gleiche Relationen bei 10^5 und 10^6 PBMC. Somit handelte es sich um einen additiven Effekt nach 24 Stunden. Bei 5 μM SAHA und 10^6 PBMC waren die Effekte der PBMC und SAHA nach unserer Definition überadditiv.

Nach 48 Stunden waren die Relationen nicht gleich bleibend. Die prozentualen Anteile für 10^5 PBMC verringerten sich in 15%-Schritten. Eine noch deutlichere Wirkung war bei den 10^6 PBMC-Werten zu erkennen. Die Reduzierung erfolgte bei 10^6 PBMC bei 1 μM SAHA um die Hälfte und bei 5 μM SAHA nochmals um ein Drittel. Dies entspricht nach unserer Definition einem synergistischen bei 10^6 PBMC und einen additiven Effekt bei 10^5 PBMC. (Abb. 14)

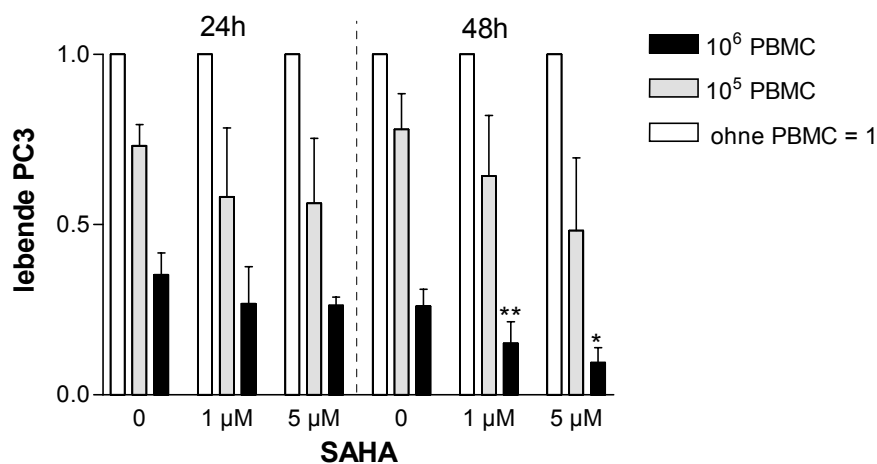


Abb. 14 Normalisierung der prozentualen Werte von SAHA und PBMC

Nach 24 Stunden wirkten SAHA und Immunezellen im Wesentlichen additiv, nach 48h synergistisch. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, Vergleich mit der jeweiligen Kontrolle ohne SAHA).

4.1.2 PC3 und NaB

Im Folgenden werden die Ergebnisse der Experimente mit der PC3-Zelllinie und NaB

dargestellt. Sowohl die aktivierten PBMC als auch NaB allein zeigten zytotoxische Effekte auf die PC3. 10^5 PBMC bewirkten nach 24 Stunden eine Reduktion der Tumorzellen auf ca. 75%. Nach 48 Stunden stieg die Zahl der Tumorzellen wieder auf ca. 80%. Bei 10^6 PBMC reduzierte sich die Zahl der Tumorzellen auf 40% nach 24 Stunden und auf ca. 30% nach 48 Stunden. Durch Inkubation mit 1mM NaB sank die Tumorzellzahl auf 60% nach 24 Stunden und stieg nach 48 Stunden auf ca. 75%. Die zytotoxische Wirkung von 1mM NaB erschien zeitlich begrenzt. Bei 5mM NaB reduzierte sich die Tumorzellzahl auf 30% nach 24 Stunden und blieb konstant bei ca. 30% nach 48 Stunden.

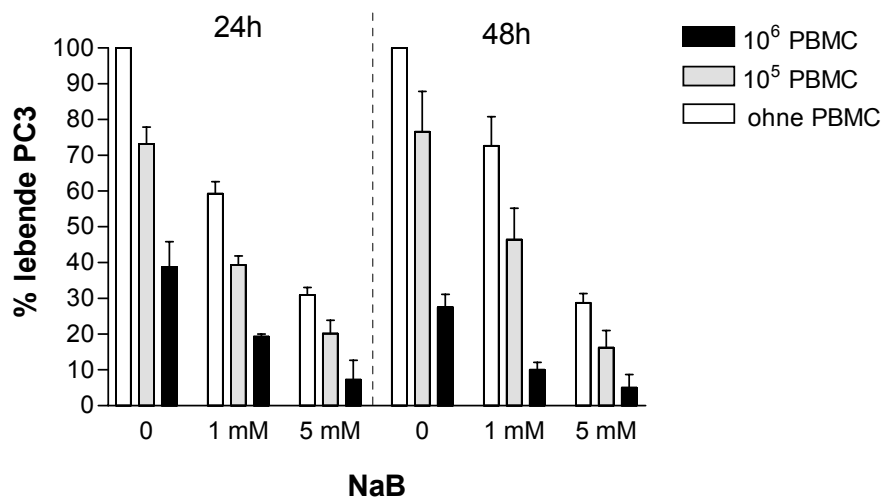


Abb. 15 Tumorzelltod in Abhängigkeit von der NaB- und PBMC-Konzentration

Sowohl die PBMC (graue und schwarze Balken) als auch NaB bewirkten eine Tumorzellreduktion. Durch die Kombination beider ergab sich eine deutliche Reduzierung der überlebenden Tumorzellen. Gezeigt sind die arithmetischen Mittel von drei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken spiegeln die Standardabweichung wider.

Kombinierte man PBMC und NaB so reduzierte sich die Zahl der überlebenden Tumorzellen bei 10^5 PBMC und 1mM NaB von 75% auf 40% und 20% bei 5mM NaB. Parallel reduzierte sich die Überlebenszahl bei 10^6 PBMC und 1mM NaB von 40% auf 20% und unter 10% bei 5mM NaB. Nach 48 Stunden zeigte sich ein ähnlicher Verlauf. Jedoch schienen die prozentualen Werte bei 10^5 PBMC und 1mM NaB im Vergleich zu den Werten nach 24 Stunden erhöht. Offenbar war auch die Kombination von PBMC und NaB in ihren Effekten zeitlich limitiert. Nach 48 Stunden verringerten sich die Werte bei 10^5 PBMC und 1mM NaB von 80% auf ca. 50% und 15% bei 5mM NaB. Parallel ergaben sich bei 10^6 PBMC und 1mM NaB Werte von 30% auf 10% und 5%

bei 5mM NaB. (Abb. 15)

Die Ergebnisse nach Normalisierung zeigten nach 24 Stunden bei 5mM einen über-additiven Effekt bei 10^6 PBMC im Vergleich zur Kontrolle ohne NaB. Bei 5mM NaB war auch eine Veränderung der Relationen der jeweiligen Werte im Vergleich zu den Werten ohne NaB erkennbar, jedoch war dies nicht signifikant. Nach 48 Stunden ergab sowohl bei 1mM und 5mM ein deutlicher Unterschied der Relationen zwischen den PBMC und NaB. Bei 10^6 PBMC und 1mM NaB lag der Wert im Bereich des Synergismus, war jedoch nicht signifikant. Nach 48 Stunden bei 5mM NaB und 10^5 PBMC war die über-additive Wirkung signifikant bei 10^6 PBMC jedoch nicht. (Abb. 16)

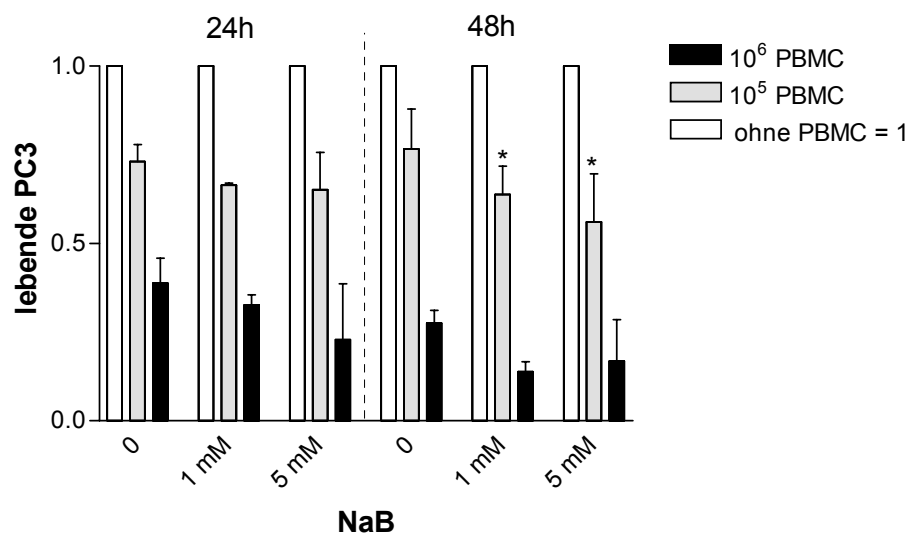


Abb. 16 Normalisierung der prozentualen Werte von NaB und PBMC

Nach 24 Stunden zeigten sich unterschiedliche Relationen bei 1 und 5mM NaB. Somit ergab sich tendenziell ein über-additiver Effekt. Nach 48 Stunden ergaben sich unterschiedliche Relationen mit deutlicher Abnahme der überlebenden Tumorzellen. Dies deutete auf einen synergistischen Effekt zwischen PBMC und NaB hin. Gezeigt sind die arithmetischen Mittel von drei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken spiegeln die Standardabweichung wider. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, Vergleich mit der jeweiligen Kontrolle ohne NaB).

4.1.3 PC3 und MS-275

Auch der HDI MS-275 zeigte zytotoxische Effekte in Kombination mit aktivierten PBMC. Es war wiederum eine Wirkung der PBMC allein und des MS-275 erkennbar.

Beide Faktoren alleine bewirkten eine Reduktion der überlebenden PC3 auf 75% bei 10^5 PBMC und $2\mu\text{M}$ MS-275 nach 24 Stunden. Eine weitere Reduktion ohne die Kombination war bei 10^6 PBMC und $10\mu\text{M}$ MS-275 auf ca. 45% beobachtbar. Wurden beide Faktoren kombiniert, zeigte sich eine geringe Reduktion. Bei 10^5 PBMC war eine Verringerung der überlebenden Tumorzellen von 75% auf 50% bei $2\mu\text{M}$ und ca. 35% bei $10\mu\text{M}$ MS-275. Bei einer PBMC-Zahl von 10^6 ergab sich eine Reduktion von 45% auf 40% bei $2\mu\text{M}$ und ca. 25% bei $10\mu\text{M}$ MS-275.

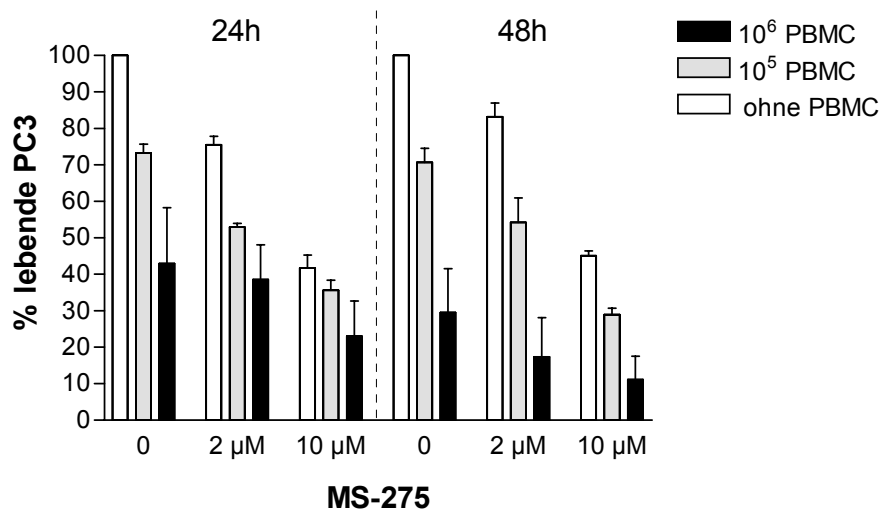


Abb. 17 Tumorzelltod in Abhängigkeit von der MS-275- und PBMC-Konzentration

Sowohl die PBMC (graue und schwarze Balken) als auch MS-275 bewirkten eine Tumorzellreduktion. Durch die Kombination beider ergab sich eine nur relativ geringe Reduzierung der überlebenden Tumorzellen sowohl bei 24 als auch nach 48 Stunden. Gezeigt sind die arithmetischen Mittel von drei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken spiegeln die Standardabweichung wider.

Ähnlich verhielt es sich nach 48 Stunden. Eine Verdopplung des Effektes auf die Tumorzellen war erst bei einer Konzentration von $10\mu\text{M}$ MS-275 möglich. So verringerte sich die Zahl der PC3 von ungefähr 30% auf 10% bei 10^6 PBMC.

Bei 10^5 PBMC fielen die Werte von 70% ohne MS-275 auf ca. 30% bei $10\mu\text{M}$ MS-275. (Abb. 17)

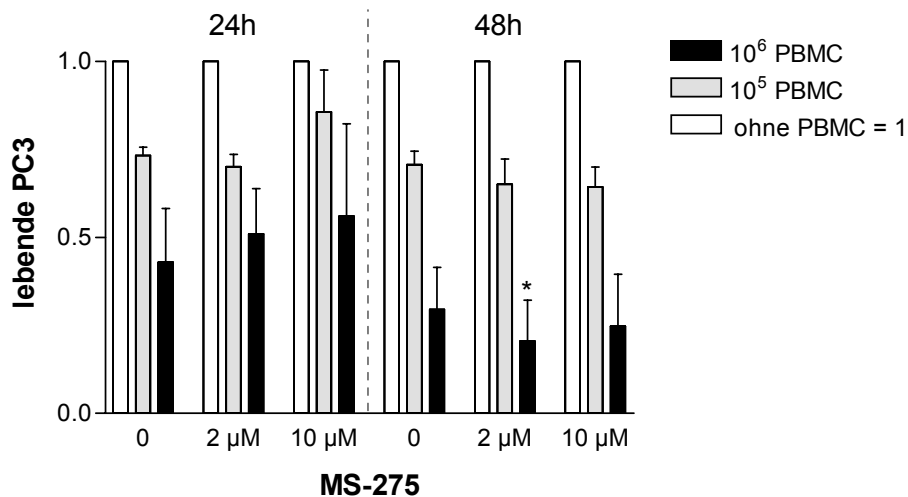


Abb. 18 Normalisierung der Prozentualen Werte von MS-275 und PBMC

Nach 24 Stunden zeigten sich abnehmende Relationen bei 2 und 10 µM MS-275. Somit ergab sich ein additiver Effekt. Nach 48 Stunden zeigten sich gleiche Relationen. Auch hier war ein additiver Effekt zu vermuten. Die Fehlerbalken spiegeln die Standardabweichung wider. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, Vergleich mit der jeweiligen Kontrolle ohne MS-275).

Die Normalisierung der prozentualen Werte der Wirkung von MS-275 und den PBMC auf die PC3 zeigte aufgrund der zum Teil sogar abnehmenden Relationen nach 24 Stunden keinen Synergismus. Auch nach 48 Stunden fielen fast gleich bleibende Relationen auf, so dass man nur einen leicht über-additiven Effekt von MS-275 und den aktivierten PBMC bei 10⁶ PBMC und 2 µM annehmen kann. (Abb. 18)

4.1.4 PC3 und Vincristin

Als Vergleich zu den relativ neuen HDIs wurden Experimente mit dem in der Tumorthherapie bekannten Zytostatikum Vincristin durchgeführt. Wie bei den anderen Experimenten war auch bei Vincristin ein zytotoxischer Effekt auf die Tumorzellen beobachtbar. Nach 24 Stunden ergab sich eine Reduktion der überlebenden PC3 auf 90% bei 2nM und auf 50% bei 10nM Vincristin. Analog zu den anderen Experimenten sah man wiederum einen zytotoxischen Effekt der PBMC. Durch die Kombination beider Faktoren fiel die Überlebenszahl der Tumorzellen nach 24 Stunden von 80% bei 10⁵ PBMC auf 70% bei 2nM und auf 35% bei 10nM Vincristin.

Parallel waren die Wirkungen bei 10^6 PBMC. Hier sanken die Werte von 45% auf ca. 35% bei 2nM und ca. 20% bei 10nM Vincristin. Nach 48 Stunden ergaben sich weniger eindeutige Effekte. Der Anteil der prozentual überlebenden Tumorzellen blieb sowohl bei 10^5 als auch bei 10^6 PBMC bei 2nM Vincristin und bei der Kontrolle ohne Vincristin annähernd gleich. Jedoch zeigte sich in allen PBMC-Konzentrationen eine Reduktion um die Hälfte bei 10nM Vincristin. (Abb. 19)

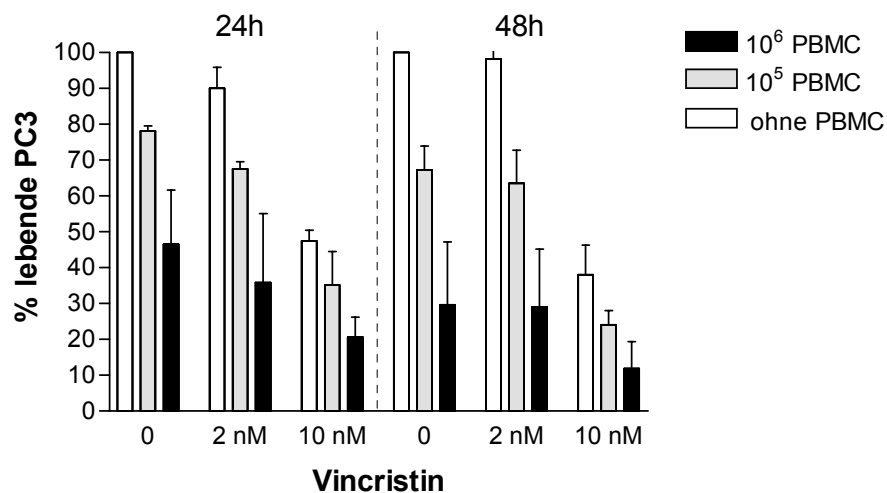


Abb. 19 Tumorzelltod in Abhängigkeit von der Vincristin- und PBMC-Konzentration

Sowohl die PBMC (graue und schwarze Balken) als auch Vincristin bewirkten eine Tumorzellreduktion. Durch die Kombination beider ergab sich eine Reduzierung der überlebenden Tumorzellen nach 24 Stunden. Nach 48 Stunden zeigten sich gleiche Werte für alle PBMC-Fraktionen bei 2nM Vincristin. Bei 10nM Vincristin war jedoch eine Reduktion um 50% beobachtbar. Gezeigt sind die arithmetischen Mittel von drei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken spiegeln die Standardabweichung wider.

Auch bei Vincristin fand eine Überprüfung, ob es sich um einen additiven oder synergistischen Effekt zwischen den PBMC und Vincristin, statt.

Es zeigten sich sowohl nach 24 als auch 48 Stunden gleich bleibende Relationen zwischen den jeweiligen PBMC-Konzentrationen bei den Vincristin-Konzentrationen von 2 und 10nM. Daraus ließ sich schließen, dass sowohl Vincristin als auch die aktivierten PBMC einen zytotoxischen Effekt auf die PC3 hatten, aber in der Kombination nur additiv wirkten. (Abb. 20)

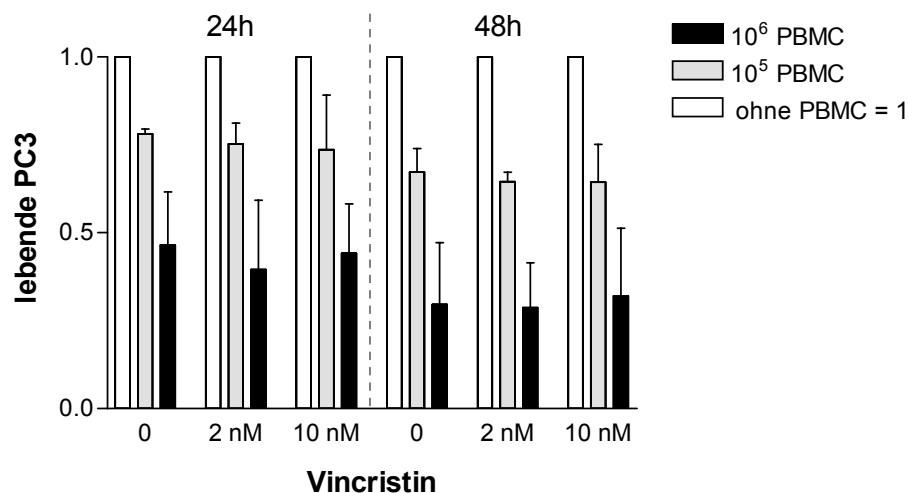


Abb. 20 Normalisierung der prozentualen Werte mit Vincristin

Nach 24 Stunden zeigten sich gleiche Relationen bei 2 und 10nM Vincristin. Somit ergab sich ein additiver Effekt. Nach 48 Stunden zeigten sich ebenfalls gleiche Relationen. Auch nach 48 Stunden war ein additiver Effekt zu beobachten. Die Fehlerbalken spiegeln die Standardabweichung wieder. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, Vergleich mit der jeweiligen Kontrolle ohne Vincristin).

4.1.5 DAOY und SAHA

Die Ergebnisse der Medulloblastomzelllinie DAOY werden im Folgenden dargestellt. Zunächst war ein Effekt der PBMC zu erkennen. Sie bewirkten in einer Konzentration von 10^5 PBMC eine Reduktion der Tumorzellzahl nach 24 Stunden auf 70% und bei 10^6 PBMC auf ca. 40%. Nach 48 Stunden lag der Anteil überlebender Zellen bei 10^5 PBMC 70%, unverändert zum 24 Stunden Wert. 10^6 PBMC waren für eine Verringerung auf ca. 30% nach 48 Stunden verantwortlich. SAHA in einer Konzentration von $1\mu\text{M}$ allein bewirkte nach 24 Stunden eine Reduktion auf ca. 85% und auf 50% bei $5\mu\text{M}$. Nach 48 Stunden erschien der Effekt von SAHA bei $1\mu\text{M}$ nachzulassen und bei $5\mu\text{M}$ blieben die Werte konstant bei 50%. Wie bei der PC3-Zelllinie nahm nach 48 Stunden die Tumorzellzahl zu. Ein zeitlich begrenzter Effekt war bei SAHA wiederum zu vermuten. Kombinierte man aktivierte PBMC und SAHA, sah man nach 24 Stunden bei 10^5 PBMC eine Reduktion von 70% (ohne SAHA) auf 60% bei $1\mu\text{M}$ SAHA und auf 25% bei $5\mu\text{M}$ SAHA. Bei 10^6 PBMC reduzierte sich die Zahl der Tumorzellen von 40% (ohne SAHA) auf ca. 25% bei $1\mu\text{M}$ SAHA und auf 5% bei $5\mu\text{M}$ SAHA. Nach 48

Stunden schienen die Wirkungen bei 10^5 PBMC und 10^6 PBMC sowohl bei $1\mu\text{M}$ als auch bei $5\mu\text{M}$ SAHA annähernd gleich zu bleiben im Vergleich zu den Werten nach 48 Stunden. (Abb. 21)

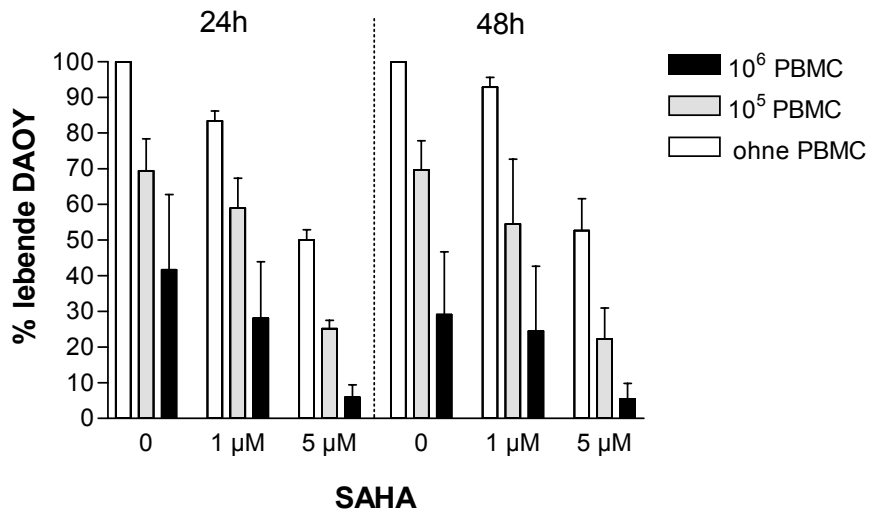


Abb. 21 Tumorzelltod in Abhängigkeit der SAHA- und PBMC-Konzentration

Sowohl die PBMC (graue und schwarze Balken) als auch SAHA bewirkten eine Tumorzellreduktion. Durch die Kombination beider ergab sich eine deutliche Reduzierung der überlebenden Tumorzellen. Gezeigt sind die arithmetischen Mittel von drei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken spiegeln die Standardabweichung wider.

Ob es sich bei den Effekten von SAHA und den aktivierten PBMC um einen additiven oder synergistischen Effekt handelte, kann eine Normalisierung der Werte auf „ohne PBMC“, welcher gleich 1 gesetzt wird, darstellen.

Es ist deutlich zu erkennen, dass nach 24 Stunden die Relationen bei $1\mu\text{M}$ SAHA bei 10^5 und 10^6 PBMC annähernd gleich im Vergleich zu den Werten ohne SAHA blieben. Bei $5\mu\text{M}$ SAHA war im Vergleich zu „ohne SAHA“ eine signifikante Vergrößerung des Verhältnisses und 10^6 PBMC zu erkennen, was für einen Synergismus spricht. Bei 10^5 PBMC zeigte sich ein über-additiver Effekt. Ähnliches galt für die Relationen nach 48 Stunden. Hier ergab sich bei $5\mu\text{M}$ SAHA ein signifikanter Synergismus bei 10^6 PBMC. (Abb. 22)

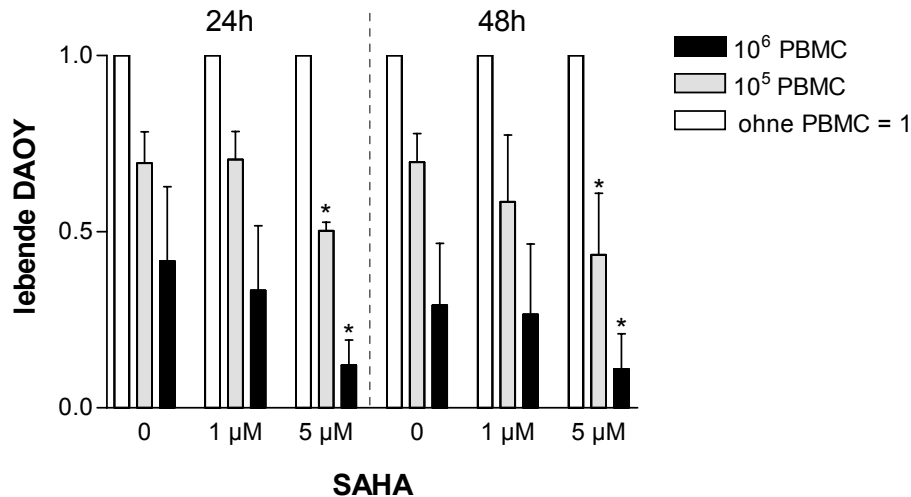


Abb. 22 Normalisierung der prozentualen Werte bei SAHA

Nach 24 Stunden zeigten sich weitestgehend zunehmende, signifikante Relationen v.a. bei den PBMC-Konzentrationen von 10⁶ im Vergleich zu „ohne SAHA“. Somit ergab sich tendenziell ein synergistischer Effekt. Nach 48 Stunden ergaben sich unterschiedliche Relationen mit deutlicher Abnahme der überlebenden Tumorzellen. Dies deutete auf einen synergistischen Effekt zwischen PBMC und SAHA hin. Die Fehlerbalken spiegeln die Standardabweichung wider. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, Vergleich mit der jeweiligen Kontrolle ohne SAHA).

4.1.6 DAOY und NaB

Auch NaB und wiederum aktivierte PBMC zeigten zytotoxische Effekte auf die Tumorzelllinie DAOY. Nach 24 Stunden erkannte man einen Effekt der PBMC der bei 10⁵ zu einer Reduktion auf ca. 70% und bei 10⁶ PBMC auf ca. 45% führte. Nach 48 Stunden nahm der prozentuale Anteil lebender Tumorzellen bei 10⁵ PBMC wieder zu. Bei 10⁶ PBMC erfolgte eine Verringerung um 15% auf ca. 30%. NaB allein bewirkte eine Tumorzellreduktion auf 60% bei 1mM und auf 45% bei 5mM NaB nach 24 Stunden. Nach 48 Stunden erhöhte sich der prozentuale Anteil bei 1mM NaB geringfügig auf ca. 65%. Anscheinend war der Effekt von 10⁵ PBMC und 1mM NaB zeitlich begrenzt und hohe Konzentrationen bewirkten einen nachhaltigeren Effekt auf die Tumorzellen. Nach 48 Stunden verringerte sich die Anzahl von lebenden DAOY bei 5mM auf ca. 35%. Kombinierte man PBMC und NaB, fiel der Anteil überlebender Tumorzellen nach 24 Stunden bei 10⁵ PBMC von 70% ohne NaB auf 40% mit 1mM NaB und auf 30% mit 5mM NaB. 10⁶ PBMC führten zu einer Verringerung von 45% ohne NaB auf 20% mit 1mM NaB und auf ca. 15% mit 5mM NaB. Nach 48 Stunden

zeigte sich bei 1mM NaB und 10^5 PBMC eine Reduktion auf ca. 40% und bei 10^6 PBMC auf ca. 15%. 5mM NaB erreichen eine Reduktion bei 10^5 PBMC auf ca. 20% und bei 10^6 PBMC auf unter 10%. (Abb. 23)

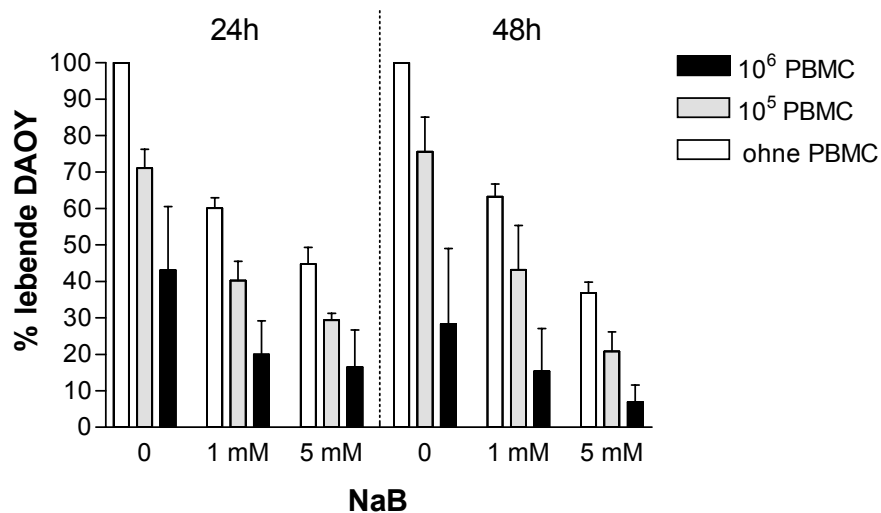


Abb. 23 Tumorzelltod in Abhängigkeit von der NaB- und PBMC-Konzentration

Sowohl die PBMC (graue und schwarze Balken) als auch NaB bewirkten eine Tumorzellreduktion. Durch die Kombination beider ergab sich eine deutliche Reduzierung der überlebenden Tumorzellen. Gezeigt sind die arithmetischen Mittel von vier unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken spiegeln die Standardabweichung wider.

Die Normalisierung der prozentualen Werte zeigte nach 24 Stunden annähernd gleich bleibende Relationen der NaB-Konzentrationen 1 und 5mM. Dies deutet auf einen additiven Effekt zwischen den aktivierten PBMC und NaB. Nach 48 Stunden ergab sich die Tendenz zunehmender Relationen. Bei 10^5 PBMC sah man bei 1mM und 5mM NaB im Vergleich zu ohne NaB eine Verringerung der Werte, so dass tendenziell ein über-additiver Effekt nach 48 Stunden zwischen den aktivierten PBMC und NaB vermutet werden kann. Jedoch ist dieser Effekt erst bei 5mM NaB und 10^5 PBMC signifikant. Auch bei 10^6 PBMC waren zunehmende Relationen bei 1 und 5mM NaB erkennbar. Die synergistische Wirkung von aktivierten 10^6 PBMC und NaB bei 5mM ist nicht signifikant. (Abb. 24)

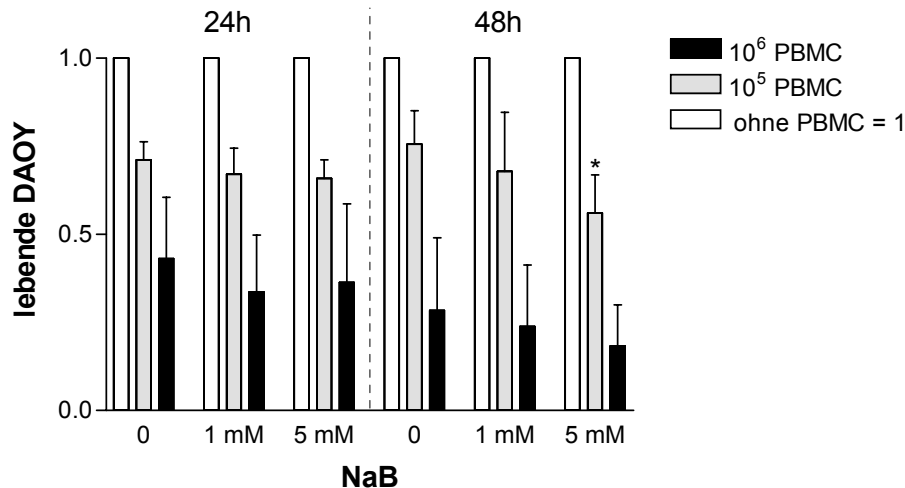


Abb. 24 Normalisierung der prozentualen Werte bei DAOY mit NaB

Nach 24 Stunden zeigten sich weitestgehend gleichbleibende Relationen im Vergleich zu ohne NaB. Somit ergibt sich tendenziell ein additiver Effekt. Nach 48 Stunden ergaben sich unterschiedliche Relationen mit Abnahme der überlebenden Tumorzellen. Dies deutete auf einen synergistischen Effekt zwischen PBMC und NaB hin, welcher jedoch erst bei 5mM signifikant wurde. Die Fehlerbalken spiegeln die Standardabweichung wider. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, Vergleich mit der jeweiligen Kontrolle ohne NaB).

4.1.7 DAOY und MS-275

Die Ergebnisse der Experimente mit DAOY und MS-275 werden im Folgenden dargestellt. Nach 24 Stunden bewirkten 10^5 PBMC eine Verringerung der DAOY auf 60% und 10^6 PBMC eine Verringerung auf 45%. MS-275 in einer Konzentration von $2\mu\text{M}$ verursachte nach 24 Stunden eine Reduktion auf ca. 75% und in einer Konzentration von $10\mu\text{M}$ auf ca. 45%. Nach 48 Stunden ergaben 10^5 PBMC eine Verkleinerung der lebenden DAOY auf 70% und 10^6 PBMC auf 40%. Die Wirkung von 10^5 PBMC erscheint zeitlich begrenzt. 10^6 PBMC erreichten eine Tumorzellreduktion auf ca. 40% nach 48 Stunden. MS-275 war nach 48 Stunden für eine Tumorzellreduktion auf 45% bei $2\mu\text{M}$ MS-275 und auf ca. 30% bei $10\mu\text{M}$ MS-275 verantwortlich. Wurden aktivierte PBMC und MS-275 kombiniert, so zeigte sich nach 48 Stunden eine Reduktion bei 10^5 PBMC und $2\mu\text{M}$ MS-275 von 60% ohne MS-275 auf ca. 50%. Bei $10\mu\text{M}$ verringerte sich die Tumorzahl auf ca. 25% bei 10^5 PBMC. Die Effekte von 10^6 PBMC und $2\mu\text{M}$ MS-275 verursachten eine Verringerung der Tumorzellen von 45% ohne MS-275 auf 25%. Nach 48 Stunden reduzierte sich die Zahl lebender Tumorzellen bei 10^5 PBMC und $2\mu\text{M}$ von 70% ohne MS-275 auf 30%. Bei

10 μ M MS-275 sogar auf ca. 10% bei 10⁵ PBMC. PBMC in einer Konzentration von 10⁶ und 2 μ M MS-275 bewirkten eine Reduzierung lebender Tumorzellen von 40% ohne MS-275 auf unter 10%. Auf unter 5% reduzierten sich die lebenden Tumorzellen bei der Kombination von 10⁶ PBMC und 10 μ M MS-275. (Abb. 25)

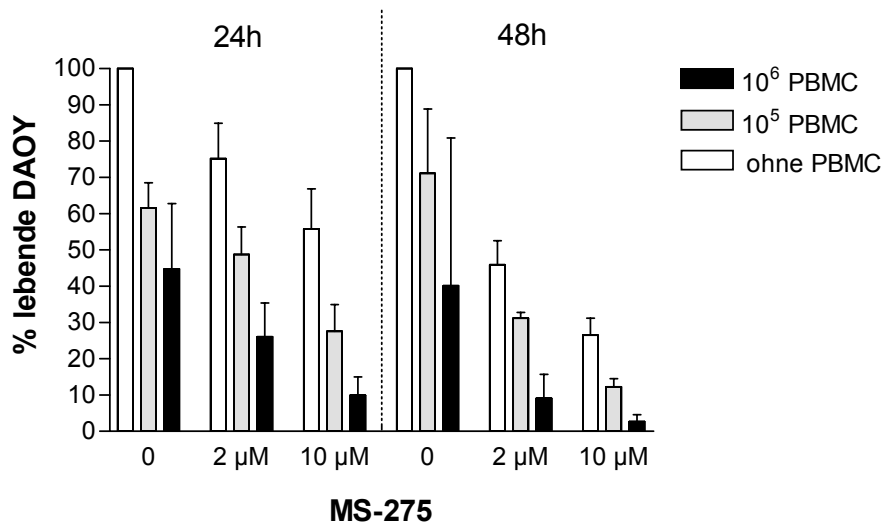


Abb. 25 Tumorzelltod in Abhängigkeit von der MS-275- und PBMC-Konzentration
Sowohl die PBMC (graue und schwarze Balken) als auch MS-275 bewirkten eine Tumorzellreduktion. Durch die Kombination beider ergab sich eine deutliche Reduzierung der lebenden Tumorzellen. Gezeigt sind die arithmetischen Mittel von drei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken spiegeln die Standardabweichung wider.

Um einen synergistischen oder additiven Effekt zwischen den aktivierten PBMC und MS-275 nachzuweisen, erfolgte wiederum eine Normalisierung auf die Werte „ohne PBMC“. Nach 24 Stunden sieht man bei 10⁵ PBMC im Vergleich zu ohne und 2 μ M MS-275 annähernd gleich bleibende Werte. Bei 10 μ M vergrößert sich das Verhältnis im Vergleich zu ohne MS-275 bei 10⁵ PBMC.

Auch bei 10⁶ PBMC ist eine Zunahme der Relationen bei 2 μ M und 10 μ M MS-275 beobachtbar. Bei 10 μ M MS-275 ist diese Wirkung signifikant. Nach 48 Stunden sind ähnliche Effekte mit der Tendenz zu einem über-additiven Effekt beobachtbar. Bei 10⁵ PBMC und 10 μ M MS-275 ist die über-additive Wirkung signifikant. (Abb. 26)

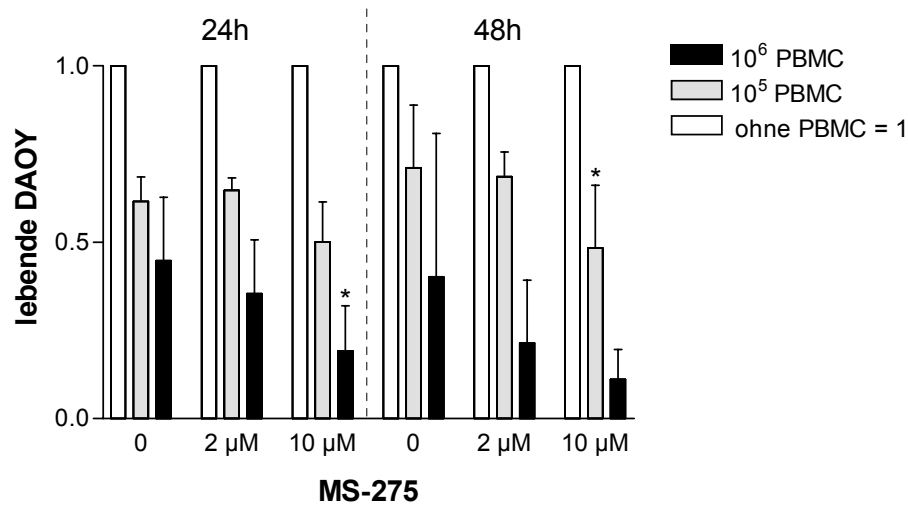


Abb. 26 Normalisierung der prozentualen Werte bei MS-275

Nach 24 Stunden zeigten sich weitestgehend gleich bleibende Relationen im Vergleich zu den Werten ohne MS-275 bei 2 µM. Bei 10 µM MS-275 vergrößerten sich die Relationen. Somit ergab sich tendenziell ein synergistischer Effekt. Nach 48 Stunden ergaben sich unterschiedliche Relationen mit Abnahme der überlebenden Tumorzellen. Dies deutete auf einen synergistischen Effekt zwischen PBMC und MS-275 hin, welcher jedoch aufgrund eines extremen einzelnen Wertes bei 10⁶ PBMC und ohne MS-275 nicht signifikant ist. Die Fehlerbalken spiegeln die Standardabweichung wider. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, Vergleich mit der jeweiligen Kontrolle ohne MS-275).

4.1.8 DAOY und Vincristin

Auch Vincristin zeigte in den Experimenten einen zytotoxischen Effekt. Die aktivierten PBMC bewirkten auch bei diesen Experimenten einen Tumorzelltod nach 24 Stunden. Bei 10⁵ PBMC ergab sich eine Reduktion auf ca. 70% und bei 10⁶ PBMC auf ca. 40%. Vincristin in einer Konzentration von 2nM war für eine Verringerung der DAOY auf ca. 85% und 10nM auf ca. 45% verantwortlich. Nach 48 Stunden konnte man bei 10⁵ PBMC eine Reduktion der DAOY auf ca. 80% erkennen, eine Zunahme um 10% im Vergleich zu dem Wert nach 24 Stunden. Scheinbar haben auch in diesem Experiment die PBMC in einer Konzentration von 10⁵ eine zeitlich begrenzte Wirkung. Bei Vincristin schienen die Werte sowohl bei 2nM als auch bei 10nM nach 48 Stunden im Vergleich zu den Werten nach 24 Stunden gleich zu bleiben mit der Tendenz einer geringen Reduzierung. Folglich ist der prozentuale Effekt von Vincristin über einen Zeitraum von 48 Stunden stabil. Kombinierte man aktivierte PBMC und Vincristin, so

erkannte man nach 24 Stunden bei 10^5 PBMC und 2nM Vincristin eine Reduktion der überlebenden Tumorzellen von 70% ohne Vincristin auf 55%. Bei 10nM Vincristin und 10^5 PBMC konnte die Zahl auf 30% reduziert werden. 10^6 PBMC in Kombination mit 2nM Vincristin bewirkten eine Verringerung von ca. 40% ohne Vincristin auf 30%. In Kombination mit 10nM Vincristin erfolgte eine nochmalige Reduktion auf ca. 20%. Nach 48 Stunden zeigten sich ähnliche Effekte. 10^5 PBMC führten bei 2nM zu einer Verringerung auf ca. 55% von 80% ausgehend und auf 30% bei 10nM Vincristin. Dies entspricht ungefähr den Werten nach 24 Stunden. Betrachtete man 10^6 PBMC nach 48 Stunden, so ergab sich eine Reduktion bei 2nM Vincristin von ca. 30% ohne Vincristin auf ca. 20% mit 2nM Vincristin. Bei 10nM Vincristin kam es in Kombination mit 10^6 PBMC nach 48 Stunden zu einer weiteren Verringerung der Tumorzellzahl auf ca. 10%. (Abb. 27)

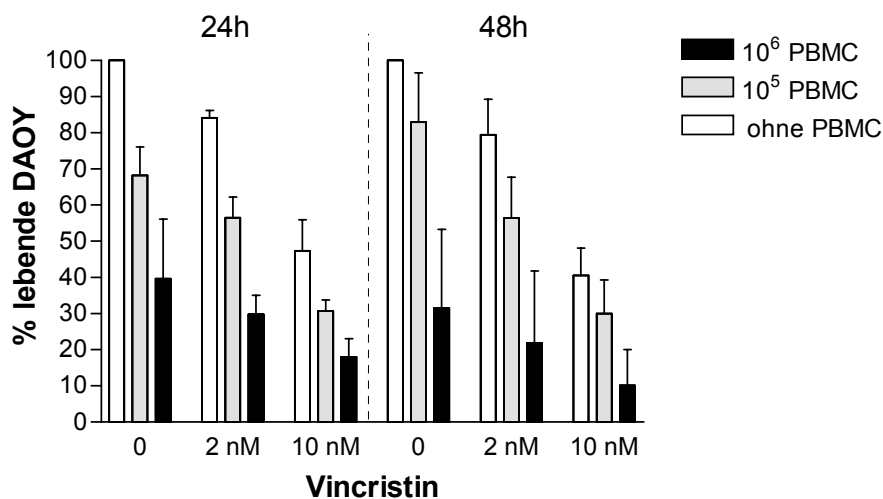


Abb. 27 Tumorzelltod in Abhängigkeit von der Vincristin- und PBMC-Konzentration
Sowohl die PBMC (graue und schwarze Balken) als auch Vincristin bewirkten eine Tumorzellreduktion. Durch die Kombination beider ergab sich eine weitere Reduzierung der lebenden Tumorzellen. Gezeigt sind die arithmetischen Mittel von drei unabhängigen Experimenten. Die Fehlerbalken spiegeln die Standardabweichung wider.

Um einen synergistischen Effekt zwischen den aktivierten PBMC und Vincristin bei der Tumorzelllinie DAOY nachzuweisen, erfolgt eine Normalisierung der prozentualen Werte auf den jeweiligen Werte „ohne PBMC“. Nach 24 Stunden sieht man bei 10^5 PBMC gleich bleibende Relationen. Der Wert bleibt konstant bei einem Anteil von ca. 0,7 jeweils für 10^5 PBMC und bei 2nM sowie 10nM Vincristin. Auch bei 10^6 PBMC und entsprechend 2nM und 10nM Vincristin bleiben die Relationen tendenziell gleich,

so dass nach 24 Stunden die Effekte von PBMC und Vincristin auf die DAOY additiv sind. Nach 48 Stunden zeigt sich bei 10^5 PBMC und 2nM sowie 10nM Vincristin auch tendenziell gleich bleibende Verhältnisse. Ähnlich verhält es sich mit 10^6 PBMC und den entsprechenden Konzentrationen von Vincristin. Eine leichte Zunahme der Relationen ist erkennbar, welche jedoch nicht signifikant ist. Insgesamt ist auch nach 48 Stunden eine additive Wirkung von aktivierten PBMC und Vincristin beobachtbar. (Abb. 28)

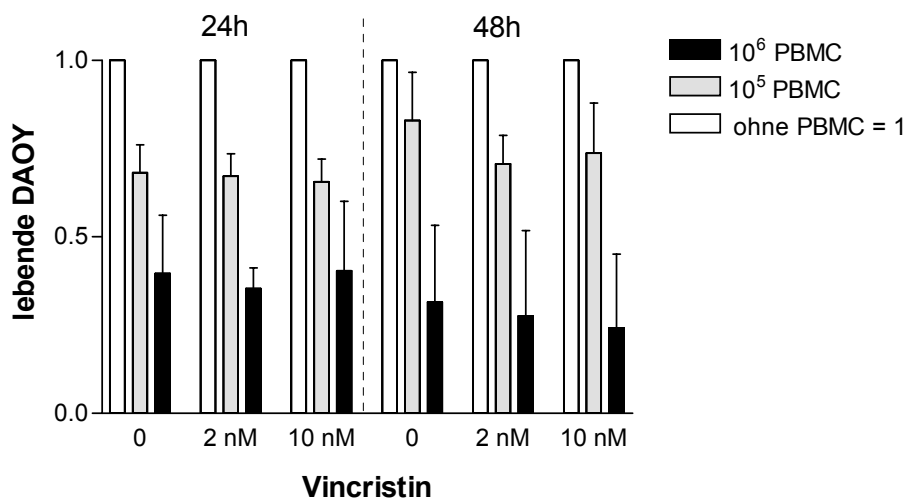


Abb. 28 Normalisierung der prozentualen Werte bei DAOY mit Vincristin

Nach 24 Stunden zeigten sich weitestgehend gleich bleibende Relationen im Vergleich zu den Werten ohne Vincristin bei 2nM und 10nM Vincristin. Somit ergab sich tendenziell ein additiver Effekt. Nach 48 Stunden ergaben sich auch gleiche Relationen. Dies deutete auf einen additiven Effekt zwischen PBMC und Vincristin hin. Die Fehlerbalken spiegeln die Standardabweichung wieder. (* $p < 0,05$, ** $p < 0,01$, Vergleich mit der jeweiligen Kontrolle ohne Vincristin).

4.1.9 Zusammenfassung der Ergebnisse

Die Calcein-Methode erwies sich wegen der starken Spontanfreisetzung des Calceins aus den Tumorzellen für unsere Fragestellung als ungeeignet.

Die Effekte von HDI in Kombination mit aktivierten PBMC auf die Tumorzelllinien waren teilweise überadditiv oder sogar synergistisch. Dies hing von der Tumorzelllinie und dem eingesetzten HDI ab. Im Gegensatz dazu zeigte das Zytostatikum Vincristin stets nur additive Effekte mit den Immunzellen. (Tab. 1)

Tab. 1 Zusammenfassung der Ergebnisse

	HDI						Zytostatikum	
	SAHA		NaB		MS-275		Vincristin	
Zelllinie	PC3	DAOY	PC3	DAOY	PC3	DAOY	PC3	DAOY
24 h	<i>über-add.</i>	synerg.	<i>über-add.</i>	additiv	additiv	synerg.	additiv	additiv
48 h	synerg.	synerg.	<i>über-add.</i>	<i>über-add.</i>	<i>über-add.</i>	<i>über-add.</i>	additiv	Additiv

5 Diskussion

In dieser Arbeit wurde gezeigt, dass HDI die Suszeptibilität von Tumorzelllinien (Prostatakarzinom und Medulloblastom) für zytotoxische Effektormechanismen des Immunsystems erhöhen können. Dies war bei dem Zytostatikum Vincristin nicht der Fall. Die Wirkungen dieser Substanz und die aktivierter Immunzellen waren nur additiv.

5.1 Effekte verschiedener HDI und Vincristin

HDI's können in vielen epithelialen und hämatologischen Tumorarten einen Zellwachstumsstillstand hervorrufen und eine weitere Zelldifferenzierung induzieren. Außerdem konnten tumortoxische Effekte bei Neuroblastomen [22], Lungentumoren [54], Prostatakarzinomen [19] und Mammakarzinomen [18] nachgewiesen werden. [25, 55, 56]

In dieser Arbeit wurde daraufhin ein durchflusszytometrisches Verfahren entwickelt, das in einen Zeitraum von mehreren Tagen überlebende Tumorzellen misst. Damit konnte gezeigt werden, dass die drei HDI's SAHA, NaB und MS-275 bei den Tumorzelllinien PC3 und DAOY dosisabhängig zu einer starken Abnahme der Zellzahl führten. Diese Abnahme ist wahrscheinlich wesentlich auf Zelltod zurückzuführen.

Die Arbeitsgruppe Sonnemann konnte mit verschiedenen Methoden zeigen, dass HDI's in diesen Zelllinien Zeichen der Apoptose auslösen: Caspase-Aktivierung, DNA-

Fragmentation und Änderung des mitochondrialen Membranpotenzials und somit Aktivierung der Caspase-9 durch aus den Mitochondrien austretendes Cytochrom c. [56, 57]

Im Gegensatz zur AG Sonnemann inkubierten wir die Tumorzellen nur 24 Stunden mit den HDIs, entfernten dann den freien Wirkstoff durch Waschen und beobachteten die Zellen weitere 48 Stunden. Dabei stellten wir fest, dass die Wirkung der HDIs mit der Zeit nachließ, und die Tumorzellen ihr Wachstum wieder aufnahmen: während direkt nach der Inkubation mit den HDIs und auch noch 24 Stunden später weniger Tumorzellen vorhanden waren als vorher, hatte ihre Zahl nach 48 Stunden deutlich zugenommen, allerdings in geringerem Maße als bei den unbehandelten Zellen. Dies bedeutet, dass die Wirkung der HDIs auf die Tumorzellen, die nicht abgetötet wurden, transient war. Hierzu könnten Membrantransporter in den Tumorzellen beigetragen haben, die die HDIs extrazellulär transportiert haben. [58] Dieser Effekt könnte die Wirksamkeit der HDIs auch bei Patienten begrenzen.

Vincristin wird als ein etabliertes Zytostatikum bei z.B. Medulloblastomen im Kindesalter genutzt und wurde deshalb in dieser Studie als Vergleichssubstanz ausgewählt [42, 59]. Vincristin bindet an das Protein Tubulin und hemmt so die Ausbildung von Mikrotubuli. Mikrotubuli bilden den so genannten Spindelapparat und sorgen bei der Zellteilung dafür, dass die jeweiligen Chromosomenpaare der neu entstandenen Zellen auseinander gezogen werden. Dadurch verhindern Vincaalkaloide wie Vincristin die Zellteilung und beeinflussen so besonders die sich schnell teilenden Zellen in Tumoren. [60]

Die zytotoxischen und zytostatischen Wirkungen von Vincristin konnten auch vergleichend dargestellt werden. Wie bei den HDIs wurde Vincristin nach 24-stündiger Inkubation ausgewaschen. Auch beobachtete man zum Zeitpunkt der Entnahme deutlich weniger Tumorzellen im Vergleich zu unbehandelten Tumorzellen. Nach 48 Stunden war ebenfalls ein erneutes Wachsen der Tumorzellen beobachtbar. Die Anzahl behandelter Tumorzellen war jedoch deutlich geringer als die der unbehandelten Tumorzellen. Zusammenfassend kann festgestellt werden, dass die Wirkungen von HDI und Vincristin auf die getesteten Tumorzelllinien vergleichbar waren, wenn diese Substanzen allein eingesetzt wurden. Die Unterschiede der HDI und Vincristin könnten in der Pharmakokinetik liegen. Obwohl wenig untersucht, ist doch die Bioverfügbarkeit

jeglicher Substanz von entscheidender klinischer Bedeutung. Die Notwendigkeit eines konstanten systemischen Konzentrationsspiegels, der nur über parenterale Zufuhr gehalten werden kann, wird wahrscheinlich die klinische Weiterentwicklung eines HDIs beeinflussen. Länger dauernde oder tägliche Infusionen sind generell nicht wünschenswert. Aus diesem Grund wurde in einer Phase I Studie von intravenöser Gabe von SAHA auf orale Verabreichung umgestellt. [33, 34] Weitere Unterschiede könnten in den Nebenwirkungen liegen. Vincristin wirkt immunsuppressiv und neurotoxisch. Auch für die HDI werden mit dem breiteren Einsatz zunehmend Nebenwirkungen beschrieben. So treten z. B. Thrombozytopenien bei Depsipeptid und SAHA sowie unspezifischen EKG-Veränderungen und Erschöpfung bei SAHA auf. Während Thrombozytopenien die Dosis limitieren, könnte man Erschöpfung und unspezifische EKG-Veränderungen ohne klinische Manifestation eventuell tolerieren. [33, 34, 61, 62]

5.2 Effekte der aktivierten PBMC

Als zytotoxische Effektorzellen setzten wir PBMC ein, die 72 Stunden durch eine hohe Konzentration von IL2 vorstimuliert waren. Solche Zellen werden in der Literatur oft als *lymphokine-activated killer cells* (LAK) bezeichnet, die wichtigsten Effektorzellen sind unter diesen Bedingungen meist aktivierte NK-Zellen. IL2 bewirkt bei aktivierten T-Lymphozyten Wachstum und Differenzierung zu Effektorzellen. Die aktivierten NK-Zellen exprimieren nach IL2-Stimulation TRAIL. [2-4, 53] Da die AG Sonnemann einen Synergismus zwischen TRAIL und HDI nachweisen konnten, verwendeten wir für Stimulation IL2. [6] Die tumor-toxischen Effekte der aktivierten PBMC im engeren Sinne der aktivierten NK-Zellen wurden sowohl in vitro als auch am Menschen bei verschiedenen Tumorarten gezeigt. Insbesondere bei Stammzelltransplantationen konnten zytolytische Aktivitäten gegen leukämische Zellen von NK-Zellen in vitro als auch am Patienten nachgewiesen und genutzt werden. Dadurch konnten Rezidive teilweise vermieden werden. [63-67]

Die Zugabe dieser aktivierten PBMC führte bei beiden Tumorzelllinien, PC3 und

DAOY, zu einer deutlichen und reproduzierbaren Abnahme der Zellzahl. Dies ist vermutlich auf die zytolytische Aktivität der in den PBMC enthaltenen aktivierten NK-Zellen zurückzuführen. Da die PBMC aus Buffy Coats von zufällig gewählten Blutspendern gewonnen wurden, waren diese nicht MHC-kompatibel. MHC-Moleküle auf der Oberfläche der Tumorzellen präsentieren körpereigene Proteine des Menschen aus denen sie extrahiert wurden. Es ist sehr unwahrscheinlich, dass die aus Blutspendern gewonnen, aktivierten PBMC die gleichen MHC-Proteine präsentieren. Somit sollten die zytotoxischen T-Zellen die Tumorzellproteine als nicht-selbst erkennen und dann zelllytisch tätig werden. Das Gleiche gilt für die NK-Zellen. Diese können bei verringerter oder fehlender MHC-Klasse-I-Expression aktiviert werden. Werden veränderte und non-self MHC-Klasse-I-Proteine von Tumorzellen präsentiert, so ergibt sich auch ein starker Stimulus für die NK-Zellen. [68] Trotzdem überlebten im Durchschnitt ca. 30% der Tumorzellen bei einer Konzentration von 10^6 Zellen, einem etwa zehnfachen Überschuss im Vergleich mit den Tumorzellen. Auch nach 48 Stunden überlebten zumindest bei 10^6 Zellen weniger Tumorzellen. Bei 10^5 Zellen war teilweise ein erneutes Wachstum der Tumorzellen beobachtbar. Möglicherweise gab es Tumorzellsubpopulationen, die generell von den PBMC nicht erkannt wurden. Da es sich um Tumorzelllinien handelte, erscheint dies allerdings nicht sehr wahrscheinlich. Es ist aber vorstellbar, dass die Tumorzellen nur in bestimmten Phasen des Zellzyklus sensitiv für einen Angriff der Immunzellen sind. Möglicherweise lag es an der zu geringen Anzahl an Immunzellen: 10:1 ist noch keine sehr große Effektor/Target-Ratio. 10^5 PBMC entsprachen einer geringen Effektor/Target-Ratio von 2:1. Trotzdem konnten 10^5 aktivierte PBMC im Durchschnitt 30% der Tumorzellen bei beiden Zelllinien töten. Teilweise wuchsen die Tumorzellen nach 48 Stunden weiter, so dass die Effekte sich verringerten. Gründe könnten ein sich innerhalb von 48 Stunden einstellender Selektionsmechanismus der Tumorzellen sein. Möglicherweise verlieren die NK-Zellen aber auch nach einer bestimmten Zeit in der Kultur ihre zytotoxische Potenz, und die überlebenden Tumorzellen können dann ungehindert weiter wachsen.

5.3 Teilweise synergistische Interaktion von HDI und aktivierten PBMC

Die AG Sonnemann konnte zeigen, dass HDI manche Tumorzelllinien für radioaktive Bestrahlung, dem Chemotherapeutikum Etoposid und TRAIL empfindlicher machen. Insbesondere TRAIL interagiert mit HDI synergistisch bei Prostata-, Lungenkarzinom- und Medulloblastomzelllinien. [6, 38] Da NK-Zellen nach Stimulation mit IL2 TRAIL exprimieren und sezernieren, verwendeten wir IL2-stimulierte PBMC um mit HDI vorinkubierte Tumorzellen zu töten.

In dieser Arbeit konnte gezeigt werden, dass SAHA mit aktivierten PBMC und somit auch LAK nach 24 Stunden über-additive und nach 48 Stunden synergistische Effekte auf die Tumorzelllinie PC3 hatte. Bei der Medulloblastomzelllinie DAOY war eine synergistische Wirkung bei 24 und 48 Stunden nachweisbar. Es gibt mehrere Erklärungsmöglichkeiten für die synergistische Wirkung von HDI und Immunzellen. HDI könnten die Erkennung der Tumorzellen durch NK-Zellen erleichtern und/oder die Apoptosewege in den Tumorzellen bahnen und dadurch die Effektorfunktion zytotoxischer Zellen unterstützen. Ein Beispiel für die erste Möglichkeit wäre die Erhöhung der Expression von *MHC class I-related chain A and B* (MICA/B), was zu einer Aktivierung über den NKG2D-Rezeptor von NK-Zellen und CTLs führen könnte. [69, 70] Durch Aktivierung von NK-Zellen über den NKG2D-Rezeptor erhöht sich deren lytische Aktivität und die Freisetzung von Perforin aus Granula der NK-Zelle führt zur Apoptose der Tumorzelle. Ob in unserem System tatsächlich NK-Zellen die wichtigsten Effektorzellen sind, und ob sie mittels TRAIL die Apoptose auslösen, muss in weiteren Experimenten geklärt werden.

Darauf, dass HDI der Apoptoresistenz von Tumorzellen entgegenwirken, gibt es bereits Hinweise: so wurde z.B. von der AG Sonnemann die Aktivierung von proapoptotischen Enzymen wie den Caspasen beschrieben. [56] Weiterhin zeigten andere Arbeitsgruppen, dass auch der TRAIL-Rezeptor in Tumorzellen hochreguliert werden kann. Da HDI die Caspase-Aktivität und die Expression von TRAIL erhöhen, könnten sich somit auch die synergistischen Effekte von HDI und aktivierten PBMC erklären. [17, 28, 38, 56, 71]

Um zu prüfen, ob HDI einer anderen Stoffklasse die gleichen Effekte wie SAHA und die PBMC auf die Tumorzelllinien PC3 und DAOY hat, wurden noch NaB und MS-275 untersucht. Bei NaB konnten zytotoxische Effekte auf PC3, DAOY und andere Zelllinien nachgewiesen werden. [38, 56] In dieser Arbeit zeigte NaB über-additive Effekte in Verbindung mit aktivierten PBMC. Obwohl für NaB die gleichen tumor-toxischen Wirkkonzentrationen gewählt wurden wie bei SAHA, ergab sich kein synergistischer Effekt mit den aktivierten PBMC. Möglicherweise hatte NaB eine geringere Potenz, die Expression vom TRAIL-Rezeptor, Capasen oder NKG2D zu beeinflussen. In dieser Arbeit konnte auch dargestellt werden, dass MS-275 mit aktivierten PBMC bei der Tumorzelllinie PC3 über-additive und bei DAOY nach 24 Stunden synergistische Effekte in Bezug auf Apoptose zeigte. Worin könnten die Gründe für unterschiedliche Effekte bei den beiden Zelllinien liegen? Unterschiedliche Tumorzelltypen reagieren möglicherweise verschieden auf bestimmte HDI, so dass ähnlich wie bei NaB die Expression vom TRAIL-Rezeptor, Capasen oder NKG2D bei unterschiedlichen Tumorzelllinien verschieden sein kann. Die Tumorzelllinie DAOY hat eine höhere Teilungsrate, somit laufen mitotische Vorgänge häufiger ab, was sie vulnerabler gegenüber Zytostatika macht als PC3. MS-275 wirkt besonders selektiv auf die HDAC1, während die anderen eingesetzten HDI auch die HDAC6 hemmen. [72] Das Protein HDAC6 ist vor allem im Cytosol anzufinden und reguliert als Tubulin-Deacetylase zusätzlich die Zellmotilität. [13] Möglicherweise ist diese Selektivität von MS-275 ein beeinflussender Faktor.

Ähnlich wie HDI die Tumorzelllinien PC3 und DAOY für den Angriff von aktivierter PBMC sensibilisieren, verbessern sie auch die Wirksamkeit anderer Therapeutika gegen Tumore. SAHA konnte in Kombination mit Standardchemotherapeutika wie Etoposid, dem immunmodulierenden Thalidomidderivat IMiD-1 und Dexamethason multiple Myelomzellen empfindlicher machen, die vorher resistent gegen eines der Therapieschemata waren. [38, 73, 74] Weiterhin konnten SAHA und NaB synergistische Effekte mit dem Phosphatidylinositol-3-Kinase-Inhibitor LY-29 zeigen. [75]

Vincristin wirkt als Zytostatikum alternierend auf die Tubulinsynthese und somit antimitotisch durch Hemmung des Aufbaus des Spindelapparates. [76-78] Die Hemmung der Mitose verursacht Zellzyklusarrest und hat keine Wirkung auf die

Expression von Genen, deren Produkte den Angriff von NK-Zellen verbessern würden. Dies erklärt, weshalb Vincristin mit Immunzellen nur additiv wirkte.

5.4 Bedeutung der Ergebnisse

Unsere in vitro gewonnenen Ergebnisse könnten zum Verständnis der klinischen Beobachtungen zur Anti-Tumor-Wirkung der HDI beitragen. Alle HDI zeigten, im Gegensatz zu Vincristin, in Verbindung mit aktivierten PBMC bei den Tumorzelllinien PC3 und DAOY in Bezug auf Apoptose einen über-additiven oder sogar einen synergistischen Effekt. Dies deutet darauf hin, dass die tumortoxische Wirkung der HDI teilweise durch das Immunsystem vermittelt sein könnte. Dies wirft die Frage auf, wie HDI auf die Zellen des Immunsystems wirken. Dies wurde bisher nur ansatzweise untersucht. Nach einer allogenen Knochenmarkstransplantation als Behandlungsstrategie bei Leukämien ist eine *Graft-Versus-Host-Disease* (GVHD) nicht erwünscht, ein Graft-Versus-Leukemia-Effekt ist dagegen gewollt. Bei Mäusen, bei denen eine Leukämie induziert wurde, konnte SAHA die GVHD-Reaktion durch Unterdrückung proinflammatorischer Cytokine vermindern. Der Graft-Versus-Leukemia-Effekt, der zumeist durch T-Zellen vermittelt wird, wurde von SAHA nicht beeinflusst. [79] In einer anderen Studie wurden die Effekte von NaB auf Kolonkarzinomzellen untersucht. Dabei konnte NaB die Suszeptibilität für Komplementwirkungen erhöhen, da NaB die Expression des *Decay-accelerating Factors* (DAF), welcher die Komplementaktivierung reguliert, vermindert. [80] Weiterhin finden sich Hinweise auf eine anti-inflammatorische Wirkung der HDI durch Suppression von INF-Gamma. Diese Effekte könnten beim Patienten die zytotoxischen Effektormechanismen des Immunsystems auf Tumorzellen vermindern und so die therapeutische Wirkung der HDI begrenzen.

6 Zusammenfassung

Histoneacetylase-Inhibitoren (HDI) wirken toxisch auf verschiedene Tumortypen. Sie lockern durch Hemmung von Histoneacetylasen die Chromatinstruktur maligner Zellen. Dadurch können sie Apoptose, Zellzyklusarrest und Differenzierung auslösen. Weiterhin ermöglichen sie die Wiederaufnahme der Transkription von Tumorsuppressorgenen sowie die verstärkte Expression proapoptotischer Proteine, und sie führen zu einer Aktivitätserhöhung von Caspasen. Werden Tumorzellen mit HDI inkubiert, erhöht sich deren Empfindlichkeit gegenüber dem *tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand* (TRAIL), so dass in Tumorzellen, die vorher nahezu resistent gegen TRAIL waren, sehr effektiv Apoptose ausgelöst wird. *Natural killer cells* (NK-Zellen) sezernieren nach Stimulation mit Interleukin 2 (IL-2) TRAIL und exprimieren das Molekül auf ihrer Zelloberfläche. Deshalb sollte in dieser Arbeit untersucht werden, ob eine Vorbehandlung mit HDI die Empfindlichkeit von Tumorzellen für zytolytische Effekte von Immunzellen erhöht.

Dafür wurden Prostatakarzinomzellen (PC3) und Medulloblastomzellen (DAOY) 24 Stunden mit verschiedenen HDI vorinkubiert und dann mit IL-2 stimulierten *peripheral blood mononuclear cells* (PBMC) konfrontiert. IL-2 stimulierte PBMC enthalten aktivierte cytotoxische T-Lymphozyten (CTL) und aktivierte NK-Zellen. Beide Zellpopulationen können prinzipiell in Tumorzellen Apoptose auslösen. Verwendete HDI waren *suberoyl anilide hydroxamic acid* (SAHA), Natriumbutyrat (NaB) und das Benzamid MS-275. Um deren Wirkungen mit einem etablierten Zytostatikum zu vergleichen, wurde Vincristin als Kontrolle eingesetzt. Die quantitative Bestimmung der Zahl überlebender Tumorzellen erfolgte 24 bzw. 48 Stunden nach der Konfrontation mit den Zytokin-aktivierten Blutzellen in einem durchflusszytometrischen Verfahren. Propidiumjodid wurde zur Identifizierung toter Tumorzellen verwendet. Die HDI SAHA, NaB und MS-275 hatten allein eine dosisabhängige zytotoxische Wirkung auf die getesteten Tumorzelllinien. In Kombination mit den aktivierten PBMC zeigten die HDI überadditive und manchmal sogar synergistische zytolytische Effekte. Dagegen wirkten Vincristin und aktivierte PBMC stets nur additiv.

Die Ergebnisse dieser Arbeit weisen darauf hin, dass die in klinischen Studien

beobachteten tumortherapeutischen Wirkungen von HDI neben ihrer direkten zytotoxischen Wirkung teilweise auf einer synergistischen Wirkung mit Effektormechanismen des Immunsystems beruhen könnten.

7 Abbildungsverzeichnis

Abb. 1	Der Aufbau von Chromatin.....	3
Abb. 2	Einteilung der HDAC.....	4
Abb. 3	Einteilung der HDI.....	5
Abb. 4	Methoden zur Tumorzelltodbestimmung	16
Abb. 5	Calceinspaltung.....	17
Abb. 6	Experimentaufbau der Calceinmethode	18
Abb. 7	Prinzip der Durchflusszytometrie:	19
Abb. 8	Experimentaufbau der FACS-Methode:.....	20
Abb. 9	Tumorzelltod in Abhängigkeit von der SAHA- und PBMC-Konzentration.....	23
Abb. 10	Fluoreszenz in Abhängigkeit von der SAHA-Konzentration und Tumorzellzahl ...	24
Abb. 11	Die FACS-Methode.....	25
Abb. 12	Tumorzelltod in Abhängigkeit von der SAHA- und PBMC-Konzentration	26
Abb. 13	Definition: Synergismus, über-additiver und additiver Effekt.....	27
Abb. 14	Normalisierung der prozentualen Werte von SAHA und PBMC.....	28
Abb. 15	Tumorzelltod in Abhängigkeit von der NaB- und PBMC-Konzentration.....	29
Abb. 16	Normalisierung der prozentualen Werte von NaB und PBMC	30
Abb. 17	Tumorzelltod in Abhängigkeit von der MS-275- und PBMC-Konzentration	31
Abb. 18	Normalisierung der Prozentualen Werte von MS-275 und PBMC.....	32
Abb. 19	Tumorzelltod in Abhängigkeit von der Vincristin- und PBMC-Konzentration	33
Abb. 20	Normalisierung der prozentualen Werte mit Vincristin.....	34
Abb. 21	Tumorzelltod in Abhängigkeit der SAHA- und PBMC-Konzentration	35
Abb. 22	Normalisierung der prozentualen Werte bei SAHA	36
Abb. 23	Tumorzelltod in Abhängigkeit von der NaB- und PBMC-Konzentration.....	37

Abb. 24	Normalisierung der prozentualen Werte bei DAOY mit NaB.....	38
Abb. 25	Tumorzelltod in Abhängigkeit von der MS-275- und PBMC-Konzentration	39
Abb. 26	Normalisierung der prozentualen Werte bei MS-275	40
Abb. 27	Tumorzelltod in Abhängigkeit von der Vincristin- und PBMC-Konzentration	41
Abb. 28	Normalisierung der prozentualen Werte bei DAOY mit Vincristin	42

8 Literaturverzeichnis

1. Burnet, F.M., *Immunological recognition of self*. Science, 1961. **133**: p. 307-11.
2. Kayagaki, N., et al., *Type I interferons (IFNs) regulate tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) expression on human T cells: A novel mechanism for the antitumor effects of type I IFNs*. J Exp Med, 1999. **189**(9): p. 1451-60.
3. Sato, K., et al., *Antiviral response by natural killer cells through TRAIL gene induction by IFN-alpha/beta*. Eur J Immunol, 2001. **31**(11): p. 3138-46.
4. Zamai, L., et al., *Natural killer (NK) cell-mediated cytotoxicity: differential use of TRAIL and Fas ligand by immature and mature primary human NK cells*. J Exp Med, 1998. **188**(12): p. 2375-80.
5. Houghton, A.N., J.S. Gold, and N.E. Blachere, *Immunity against cancer: lessons learned from melanoma*. Curr Opin Immunol, 2001. **13**(2): p. 134-40.
6. Sonnemann, J., et al., *Histone deacetylase inhibitors interact synergistically with tumor necrosis factor-related apoptosis-inducing ligand (TRAIL) to induce apoptosis in carcinoma cell lines*. Invest New Drugs, 2005. **23**(2): p. 99-109.
7. Forsberg, E.C. and E.H. Bresnick, *Histone acetylation beyond promoters: long-range acetylation patterns in the chromatin world*. Bioessays, 2001. **23**(9): p. 820-30.
8. Wade, P.A., *Transcriptional control at regulatory checkpoints by histone deacetylases: molecular connections between cancer and chromatin*. Hum Mol Genet, 2001. **10**(7): p. 693-8.
9. Ito, K., P.J. Barnes, and I.M. Adcock, *Glucocorticoid receptor recruitment of histone deacetylase 2 inhibits interleukin-1beta-induced histone H4 acetylation on lysines 8 and 12*. Mol Cell Biol, 2000. **20**(18): p. 6891-903.
10. Cress, W.D. and E. Seto, *Histone deacetylases, transcriptional control, and cancer*. J Cell Physiol, 2000. **184**(1): p. 1-16.
11. Timmermann, S., et al., *Histone acetylation and disease*. Cell Mol Life Sci, 2001. **58**(5-6): p. 728-36.
12. de Ruijter, A.J., et al., *Histone deacetylases (HDACs): characterization of the classical HDAC family*. Biochem J, 2003. **370**(Pt 3): p. 737-49.
13. Hubbert, C., et al., *HDAC6 is a microtubule-associated deacetylase*. Nature, 2002. **417**(6887): p. 455-8.
14. Finnin, M.S., et al., *Structures of a histone deacetylase homologue bound to the TSA and SAHA inhibitors*. Nature, 1999. **401**(6749): p. 188-93.
15. Drummond, D.C., et al., *Clinical development of histone deacetylase inhibitors as anticancer agents*. Annu Rev Pharmacol Toxicol, 2005. **45**: p. 495-528.
16. Park, W.H., et al., *Trichostatin inhibits the growth of ACHN renal cell carcinoma cells via cell cycle arrest in association with p27, or apoptosis*. Int J Oncol, 2003. **22**(5): p. 1129-34.
17. Butler, L.M., et al., *The histone deacetylase inhibitor, suberoylanilide*

- hydroxamic acid, overcomes resistance of human breast cancer cells to Apo2L/TRAIL*. Int J Cancer, 2006. **119**(4): p. 944-954.
18. Schmidt, K., R. Gust, and M. Jung, *Inhibitors of histone deacetylase suppress the growth of MCF-7 breast cancer cells*. Arch Pharm (Weinheim), 1999. **332**(10): p. 353-7.
 19. Butler, L.M., et al., *Suberoylanilide hydroxamic acid, an inhibitor of histone deacetylase, suppresses the growth of prostate cancer cells in vitro and in vivo*. Cancer Res, 2000. **60**(18): p. 5165-70.
 20. Qian, D.Z., et al., *In vivo imaging of retinoic acid receptor beta2 transcriptional activation by the histone deacetylase inhibitor MS-275 in retinoid-resistant prostate cancer cells*. Prostate, 2005. **64**(1): p. 20-8.
 21. Coffey, D.C., et al., *Histone deacetylase inhibitors and retinoic acids inhibit growth of human neuroblastoma in vitro*. Med Pediatr Oncol, 2000. **35**(6): p. 577-81.
 22. Glick, R.D., et al., *Hybrid polar histone deacetylase inhibitor induces apoptosis and CD95/CD95 ligand expression in human neuroblastoma*. Cancer Res, 1999. **59**(17): p. 4392-9.
 23. Jaboin, J., et al., *MS-27-275, an inhibitor of histone deacetylase, has marked in vitro and in vivo antitumor activity against pediatric solid tumors*. Cancer Res, 2002. **62**(21): p. 6108-15.
 24. Saito, A., et al., *A synthetic inhibitor of histone deacetylase, MS-27-275, with marked in vivo antitumor activity against human tumors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 1999. **96**(8): p. 4592-7.
 25. Blagosklonny, M.V., et al., *Histone deacetylase inhibitors all induce p21 but differentially cause tubulin acetylation, mitotic arrest, and cytotoxicity*. Mol Cancer Ther, 2002. **1**(11): p. 937-41.
 26. Kim, M.S., et al., *Histone deacetylases induce angiogenesis by negative regulation of tumor suppressor genes*. Nat Med, 2001. **7**(4): p. 437-43.
 27. Bernhard, D., et al., *Inhibition of histone deacetylase activity enhances Fas receptor-mediated apoptosis in leukemic lymphoblasts*. Cell Death Differ, 2001. **8**(10): p. 1014-21.
 28. Nakata, S., et al., *Histone deacetylase inhibitors upregulate death receptor 5/TRAIL-R2 and sensitize apoptosis induced by TRAIL/APO2-L in human malignant tumor cells*. Oncogene, 2004. **23**(37): p. 6261-71.
 29. Glaser, K.B., et al., *Gene expression profiling of multiple histone deacetylase (HDAC) inhibitors: defining a common gene set produced by HDAC inhibition in T24 and MDA carcinoma cell lines*. Mol Cancer Ther, 2003. **2**(2): p. 151-63.
 30. Van Lint, C., S. Emiliani, and E. Verdin, *The expression of a small fraction of cellular genes is changed in response to histone hyperacetylation*. Gene Expr, 1996. **5**(4-5): p. 245-53.
 31. Peart, M.J., et al., *Identification and functional significance of genes regulated by structurally different histone deacetylase inhibitors*. Proc Natl Acad Sci U S A, 2005. **102**(10): p. 3697-702.
 32. O'Connor, O.A., et al., *Clinical experience with intravenous and oral formulations of the novel histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid in patients with advanced hematologic malignancies*. J Clin Oncol, 2006. **24**(1): p. 166-73.
 33. Kelly, W.K., et al., *Phase I clinical trial of histone deacetylase inhibitor:*

- suberoylanilide hydroxamic acid administered intravenously*. Clin Cancer Res, 2003. **9**(10 Pt 1): p. 3578-88.
34. Kelly, W.K., et al., *Phase I study of an oral histone deacetylase inhibitor, suberoylanilide hydroxamic acid, in patients with advanced cancer*. J Clin Oncol, 2005. **23**(17): p. 3923-31.
35. Kelly, W.K. and P.A. Marks, *Drug insight: Histone deacetylase inhibitors--development of the new targeted anticancer agent suberoylanilide hydroxamic acid*. Nat Clin Pract Oncol, 2005. **2**(3): p. 150-7.
36. Ryan, Q.C., et al., *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, 2005. **23**(17): p. 3912-22.
37. Pauer, L.R., et al., *Phase I study of oral CI-994 in combination with carboplatin and paclitaxel in the treatment of patients with advanced solid tumors*. Cancer Invest, 2004. **22**(6): p. 886-96.
38. Sonnemann, J., et al., *Histone deacetylase inhibitors induce cell death and enhance the susceptibility to ionizing radiation, etoposide, and TRAIL in medulloblastoma cells*. Int J Oncol, 2006. **28**(3): p. 755-66.
39. Richards, D.A., et al., *Gemcitabine plus CI-994 offers no advantage over gemcitabine alone in the treatment of patients with advanced pancreatic cancer: results of a phase II randomized, double-blind, placebo-controlled, multicenter study*. Ann Oncol, 2006. **17**(7): p. 1096-102.
40. Robertson, P.L., *Advances in treatment of pediatric brain tumors*. NeuroRx, 2006. **3**(2): p. 276-91.
41. Packer, R.J., *Progress and challenges in childhood brain tumors*. J Neurooncol, 2005. **75**(3): p. 239-42.
42. Packer, R.J., et al., *Treatment of children with medulloblastomas with reduced-dose craniospinal radiation therapy and adjuvant chemotherapy: A Children's Cancer Group Study*. J Clin Oncol, 1999. **17**(7): p. 2127-36.
43. Mulhern, R.K., et al., *Late neurocognitive sequelae in survivors of brain tumours in childhood*. Lancet Oncol, 2004. **5**(7): p. 399-408.
44. Farkas, A., et al., *National trends in the epidemiology of prostate cancer, 1973 to 1994: evidence for the effectiveness of prostate-specific antigen screening*. Urology, 1998. **52**(3): p. 444-8; discussion 448-9.
45. Thomas, C., et al., *Spezielle Pathologie*. Vol. 1. 1996: Schattauer. 389-393.
46. Stein, A., et al., *Prostate specific antigen levels after radical prostatectomy in patients with organ confined and locally extensive prostate cancer*. J Urol, 1992. **147**(3 Pt 2): p. 942-6.
47. Trojan, L., et al., *Prostate cancer therapy: standard management, new options and experimental approaches*. Anticancer Res, 2005. **25**(1B): p. 551-61.
48. Holmberg, L., et al., *A randomized trial comparing radical prostatectomy with watchful waiting in early prostate cancer*. N Engl J Med, 2002. **347**(11): p. 781-9.
49. Epstein, J.I., et al., *Prognosis of untreated stage A1 prostatic carcinoma: a study of 94 cases with extended followup*. J Urol, 1986. **136**(4): p. 837-9.
50. Robinson, M.R., et al., *The final analysis of the EORTC Genito-Urinary Tract Cancer Co-Operative Group phase III clinical trial (protocol 30805) comparing orchidectomy, orchidectomy plus cyproterone acetate and low dose stilboestrol in the management of metastatic carcinoma of the prostate*. Eur Urol, 1995.

- 28(4): p. 273-83.
51. Bolla, M., et al., *Improved survival in patients with locally advanced prostate cancer treated with radiotherapy and goserelin*. N Engl J Med, 1997. **337**(5): p. 295-300.
 52. Bolla, M., et al., *Long-term results with immediate androgen suppression and external irradiation in patients with locally advanced prostate cancer (an EORTC study): a phase III randomised trial*. Lancet, 2002. **360**(9327): p. 103-6.
 53. Kayagaki, N., et al., *Involvement of TNF-related apoptosis-inducing ligand in human CD4+ T cell-mediated cytotoxicity*. J Immunol, 1999. **162**(5): p. 2639-47.
 54. Zhu, W.G., et al., *DNA methyltransferase inhibition enhances apoptosis induced by histone deacetylase inhibitors*. Cancer Res, 2001. **61**(4): p. 1327-33.
 55. Marks, P., et al., *Histone deacetylases and cancer: causes and therapies*. Nat Rev Cancer, 2001. **1**(3): p. 194-202.
 56. Sonnemann, J., et al., *Histone deacetylase inhibitors require caspase activity to induce apoptosis in lung and prostate carcinoma cells*. Cancer Lett, 2006. **232**(2): p. 148-60.
 57. Marks, P.A. and X. Jiang, *Histone deacetylase inhibitors in programmed cell death and cancer therapy*. Cell Cycle, 2005. **4**(4): p. 549-51.
 58. Majumdar, S., S. Duvvuri, and A.K. Mitra, *Membrane transporter/receptor-targeted prodrug design: strategies for human and veterinary drug development*. Adv Drug Deliv Rev, 2004. **56**(10): p. 1437-52.
 59. Packer, R.J., et al., *Outcome for children with medulloblastoma treated with radiation and cisplatin, CCNU, and vincristine chemotherapy*. J Neurosurg, 1994. **81**(5): p. 690-8.
 60. Lüllmann, H., Mohr, K., *Pharmakologie und Toxikologie*. Vol. 14. Auflage. 1999. 459.
 61. Sandor, V., et al., *Phase I trial of the histone deacetylase inhibitor, depsipeptide (FR901228, NSC 630176), in patients with refractory neoplasms*. Clin Cancer Res, 2002. **8**(3): p. 718-28.
 62. Piekarczyk, R.L., et al., *Inhibitor of histone deacetylation, depsipeptide (FR901228), in the treatment of peripheral and cutaneous T-cell lymphoma: a case report*. Blood, 2001. **98**(9): p. 2865-8.
 63. Koehl, U., et al., *Ex vivo expansion of highly purified NK cells for immunotherapy after haploidentical stem cell transplantation in children*. Klin Padiatr, 2005. **217**(6): p. 345-50.
 64. Ruggeri, L., et al., *The impact of donor natural killer cell alloreactivity on allogeneic hematopoietic transplantation*. Transpl Immunol, 2005. **14**(3-4): p. 203-6.
 65. Tajima, F., et al., *Natural killer cell activity and cytokine production as prognostic factors in adult acute leukemia*. Leukemia, 1996. **10**(3): p. 478-82.
 66. Lowdell, M.W., et al., *Evidence that continued remission in patients treated for acute leukaemia is dependent upon autologous natural killer cells*. Br J Haematol, 2002. **117**(4): p. 821-7.
 67. Xiang, J., et al., *Regression of engineered myeloma cells secreting interferon-gamma-inducing factor is mediated by both CD4(+)/CD8(+) T and natural killer cells*. Leuk Res, 2001. **25**(10): p. 909-15.
 68. Janeway, C.A., et al., *Immunologie*. Vol. 5. Auflage. 2002: Spektrum -

- akademischer Verlag. 87 - 90.
69. Skov, S., et al., *Cancer cells become susceptible to natural killer cell killing after exposure to histone deacetylase inhibitors due to glycogen synthase kinase-3-dependent expression of MHC class I-related chain A and B*. *Cancer Res*, 2005. **65**(23): p. 11136-45.
 70. Armeanu, S., et al., *Natural killer cell-mediated lysis of hepatoma cells via specific induction of NKG2D ligands by the histone deacetylase inhibitor sodium valproate*. *Cancer Res*, 2005. **65**(14): p. 6321-9.
 71. Ruefli, A.A., et al., *Suberoylanilide hydroxamic acid (SAHA) overcomes multidrug resistance and induces cell death in P-glycoprotein-expressing cells*. *Int J Cancer*, 2002. **99**(2): p. 292-8.
 72. Chen, C.S., et al., *Histone acetylation-independent effect of histone deacetylase inhibitors on Akt through the reshuffling of protein phosphatase 1 complexes*. *J Biol Chem*, 2005. **280**(46): p. 38879-87.
 73. Mitsiades, C.S., et al., *Transcriptional signature of histone deacetylase inhibition in multiple myeloma: biological and clinical implications*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(2): p. 540-5.
 74. Kim, M.S., et al., *Inhibition of histone deacetylase increases cytotoxicity to anticancer drugs targeting DNA*. *Cancer Res*, 2003. **63**(21): p. 7291-300.
 75. Rahmani, M., et al., *Inhibition of PI-3 kinase sensitizes human leukemic cells to histone deacetylase inhibitor-mediated apoptosis through p44/42 MAP kinase inactivation and abrogation of p21(CIP1/WAF1) induction rather than AKT inhibition*. *Oncogene*, 2003. **22**(40): p. 6231-42.
 76. Kavallaris, M., et al., *Multiple Microtubule Alterations Are Associated with Vinca Alkaloid Resistance in Human Leukemia Cells*. *Cancer Res*, 2001. **61**(15): p. 5803-5809.
 77. Aisenberg, A.C. and B. Wiles, *Studies on the Suppression of Immune Responses by the Periwinkle Alkaloids Vincristine and Vinblastine*. *J Clin Invest*, 1964. **43**: p. 2394-403.
 78. Aisenberg, A.C., *Suppression of Immune Response by 'Vincristine' and 'Vinblastine'*. *Nature*, 1963. **200**: p. 484.
 79. Reddy, P., et al., *Histone deacetylase inhibitor suberoylanilide hydroxamic acid reduces acute graft-versus-host disease and preserves graft-versus-leukemia effect*. *Proc Natl Acad Sci U S A*, 2004. **101**(11): p. 3921-6.
 80. Andoh, A., et al., *Sodium butyrate enhances complement-mediated cell injury via down-regulation of decay-accelerating factor expression in colonic cancer cells*. *Cancer Immunol Immunother*, 2002. **50**(12): p. 663-72.

Eidesstattliche Erklärung

Hiermit erkläre ich, dass ich die vorliegende Dissertation selbständig verfasst und keine anderen als die angegebenen Hilfsmittel benutzt habe.

Die Dissertation ist bisher keiner anderen Fakultät vorgelegt worden.

Ich erkläre, dass ich bisher kein Promotionsverfahren erfolglos beendet habe und dass eine Aberkennung eines bereits erworbenen Doktorgrades nicht vorliegt.

Dresden, den 24. September 2007

André Braun

Persönliche Daten:

Geburtsdatum: 30. September 1978 in Ueckermünde
Familienstand: verheiratet, 1 Kind

Schulbildung:

Juni 1997 Allgemeine Hochschulreife Kopernikus
Gymnasium in Torgelow

Grundwehrdienst:

Juli 1997 bis April 1998 Ausbildung zum Sanitätssoldaten

Studium:

Oktober 1998 bis August 2003 Studium der Humanmedizin an der Universität
Greifswald
August 2000 Ärztliche Vorprüfung, Physikum
August 2001 Erster Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, 1.
Staatsexamen
August 2003 Zweiter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, 2.
Staatsexamen
Dezember 2004 Dritter Abschnitt der Ärztlichen Prüfung, 3.
Staatsexamen
Februar 2005 Approbation als Arzt

Praktische Tätigkeiten:

1.07. – 31.08. 1998 Krankenpflegepraktikum am Kinderzentrum
München, Großhadern
12.02. – 14.03. 2001 Famulatur in der Nephrologie, Klinik für Innere
Medizin, Greifswald
11.03. – 25.03. 2002 Famulatur in der internistischen Notaufnahme,
Klinik für Innere Medizin, Greifswald
15.07. – 13.08. 2002 Famulatur bei Frau Dr. med. Fischer,
niedergelassene Fachärztin für Innere Medizin
und Rheumatologie, Greifswald
19.08. – 2.10. 2002 Famulatur in der chirurgischen Notaufnahme,
Charité Berlin

Praktisches Jahr:

20.10. 2003 – 6.02. 2004 Innere Medizin am Frere Hospital East London,
Südafrika
9.02. – 28.05. 2004 Chirurgie am Zentralkrankenhaus Ostrobotnia
Kokkola, Finnland
31.05. – 20.08. 2004 Kinderchirurgie, Kinderzentrum der Universität
Greifswald

Ärztliche Tätigkeiten:

Seit Oktober 2005

Assistenzarzt am Neurologischen
Rehabilitationszentrum für Kinder und
Jugendliche in Kreischa

Wissenschaftliche Tätigkeiten:

August 2004

Promotionsarbeit am Institut für Immunologie
der Universität Greifswald

Mai 2005

Promotionsstipendium des Graduierten-kollegs
der Alfred Krupp von Bohlen und Halbach-
Stiftung

2.06. – 5.06. 2005

Posterpräsentation und Mitorganisation der
„Euroconference on the interactions between
innate and adaptive immunity in mammalian
defense against bacterial infections“ in
Joachimsthal

Dresden, den 24. September 2007

André Braun

Danksagung

Größten Dank gilt Frau Prof. Barbara Bröker und Herr Prof. James F. Beck für die vertrauensvolle Überlassung des Themas. Insbesondere danke ich Ihnen für die geduldige Betreuung während der praktischen Arbeit als auch für die Phase danach.

Weiterhin danke ich dem Graduiertenkolleg „Tumorbiologie“, der von der Alfred Krupp von Bohlen und Halbach-Stiftung gefördert wird, für die finanzielle Unterstützung dieser Arbeit.

Außerdem danke ich allen Mitarbeitern der Immunologie und der Transfusionsmedizin. Besonderen Dank gilt Frau Erika Friebe für die sanfte und geduldige Anleitung in Laborarbeiten. Des Weiteren danke ich den Menschen im Labor für die familiäre Atmosphäre.

Ganz besonderen Dank gilt meiner Frau Nadine für die Motivation, Unterstützung und Geduld vor allem in der letzten Phase der Arbeit.